

MÁSTER EN GESTIÓN INTEGRAL DEL AGUA

MÓDULO DE APLICACIÓN

DETERMINACIÓN DE SUBTRAZAS DE COBRE EN AGUAS, PREVIA PRECONCENTRACIÓN CON DISCOS DE SDB MODIFICADOS

Autora: Margarita Isabel Díaz de Alba
Directora: Dra. María Dolores Galindo Riaño

DETERMINACIÓN DE SUBTRAZAS DE COBRE EN AGUAS NATURALES, PREVIA PRECONCENTRACIÓN CON DISCOS DE SDB MODIFICADOS

Memoria presentada por Margarita Isabel Díaz de Alba, para optar al título de
Máster en Gestión Integral del Agua, de la Universidad de Cádiz.

Fdo. Margarita Isabel Díaz de Alba
Diciembre de 2007

El presente trabajo de investigación ha sido realizado íntegramente en los
laboratorios del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz, dentro
del Grupo de Investigación Geoquímica Marina y bajo la dirección de la Profesora
Titular de Universidad Dra. Dña. María Dolores Galindo Riaño.



DEPARTAMENTO DE
QUÍMICA ANALÍTICA

Fdo. Dra. Dña. María Dolores Galindo Riaño
Diciembre de 2007

Objetivos

OBJETIVOS

Los estudios desarrollados en el presente trabajo se han enfocado a la consecución de una serie de objetivos, los cuales pueden describirse como sigue:

1. Estudio de la aplicabilidad del reactivo orgánico *saliciloilhidrazona del piridoxal* en el análisis de trazas de cobre en aguas naturales.
2. Utilidad de la técnica de preconcentración por extracción en fase sólida con discos de membrana en el análisis de metales traza en muestras medioambientales.
3. Desarrollo y optimización de un método de preconcentración de trazas de cobre en muestras de aguas, mediante el empleo de un sistema de extracción en fase sólida basado en la complejación de este metal con la *saliciloilhidrazona del piridoxal*, su retención en un disco de membrana de poliestireno divinibenceno y su posterior elución y detección mediante Espectrometría de Absorción Atómica.

Índice

ÍNDICE

	Página
INTRODUCCIÓN	1
I. El Cobre.....	3
II. Métodos de determinación de cobre: Extracción en fase sólida.....	5
II.1. Tipos de adsorbentes y selección adecuada de discos.....	9
II.2. Aplicabilidad de las hidrazonas en extracción en fase sólida con discos de membrana.....	11
MATERIAL Y MÉTODO	18
III. Reactivos y disoluciones.....	18
III.1. Reactivos.....	18
III.2. Disoluciones.....	18
IV. Material e instrumentos utilizados.....	21
V. Método desarrollado.....	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
VI. Ensayos preliminares.....	27
VI.1. Elección de un reactivo orgánico.....	27
VI.2. Estudio de la estequiometría del complejo PSH-Cu.....	33
VII. Optimización del método.....	35
VII.1. Influencia de la naturaleza del eluyente en la extracción en fase sólida con membrana SDB inmovilizada con PSH.....	36
VII.2. Estudio del volumen de eluyente en la recuperación del metal.....	39
VII.3. Influencia del pH de la muestra en la extracción en fase sólida de Cu(II) con membrana SDB inmovilizada con PSH.....	41
VII.4. Estudio de la influencia de la cantidad de reactivo inmovilizado en el filtro de membrana de SDB en la recuperación del metal.....	42
VIII. Procedimiento propuesto para la preconcentración de Cu(II).....	43
IX. Características analíticas del método.....	43

IX.1. Intervalo de aplicabilidad del método: cantidad de metal en la muestra de agua.....	44
IX.2. Intervalo de aplicabilidad del método: volumen de muestra.....	44
IX.3. Reproducibilidad de la medida.....	45
<u>CONCLUSIONES</u>	47
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	49

Introducción

INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso vital para la alimentación, higiene y actividades del ser humano, así como para la agricultura y la industria. Desde la antigüedad el hombre ha establecido sus poblaciones en zonas próximas a los cursos de agua, no sólo porque ésta es imprescindible para la vida, sino porque es útil para muchas de las actividades que desarrolla. Debido a ello, los ríos han sido con frecuencia los receptores de muchos de los residuos generados por el hombre.

El crecimiento de la industria, de la urbanización y de la población humana, junto con el uso creciente de abonos y plaguicidas en agricultura influyen notablemente en el deterioro de la calidad de las aguas naturales y acrecienta los problemas de contaminación y en consecuencia el suministro de agua potable.

Para poder adoptar soluciones, es necesario conocer las posibles causas y fuentes de contaminación del medio hídrico. La contaminación acuática puede ser puntual (en el caso de que se produzca por un foco emisor determinado e identificable afectando a una zona concreta) o difusa (cuando el origen no está claramente definido y se ven afectadas zonas amplias en las que coexisten múltiples focos de emisión). En sentido general, podemos considerar como fuentes de contaminación del medio hídrico, las aguas residuales urbanas, las industriales, las agrícolas/ganaderas, y los aportes atmosféricos.

Asimismo, podemos clasificar los contaminantes básicos que pueden encontrarse en las aguas naturales en 4 grupos [1]:

- Contaminantes orgánicos, como pueden ser pesticidas, hidrocarburos o tensioactivos.
- Contaminantes radiactivos, tanto de origen natural como antropogénico.
- Contaminantes biológicos, como bacterias, hongos o virus, todos ellos portadores de enfermedades.
- Contaminantes inorgánicos, como los metales pesados.

Este último grupo, los metales pesados, presentan tres aspectos fundamentales que los caracterizan:

1. No se eliminan ni biotransforman en los ecosistemas acuáticos por procesos naturales, a diferencia de la mayoría de los contaminantes orgánicos.
2. La mayoría de dichos metales se ven enriquecidos en minerales y en sustancias orgánicas que llegan al agua, tendiendo a acumularse en la materia suspendida y en las capas superficiales de los sedimentos.
3. Son contaminantes biodisponibles para los organismos vivos, se bioacumulan en éstos y sufren un proceso de biomagnificación a través de la cadena trófica.

De los 106 elementos conocidos por el hombre, 84 son metales, por lo que no es de extrañar que las posibilidades de contaminación metálica en el ambiente sean numerosas. Hay que tener presente que los metales son materias naturales que, desde la edad de hierro, han desempeñado un papel fundamental en el desarrollo de las civilizaciones. El problema surge cuando prolifera su uso industrial. Su empleo creciente en la vida cotidiana termina por afectar a la salud. De hecho, el crecimiento demográfico en zonas urbanas y la rápida industrialización han provocado serios problemas de contaminación y deterioro del ambiente, sobre todo, en los países en vías de desarrollo.

Pero no todos los metales son peligrosos; algunos, pese a su toxicidad, se presentan de forma muy escasa o insoluble, por lo que el número de estos productos perjudiciales para la salud sólo engloba a unos pocos. De entre ellos, destacan el plomo y el mercurio, seguidos por el berilio, el bario, el cadmio, el cobre, el manganeso, el níquel, el estaño, el vanadio y el cinc [2]. Su presencia natural no debería ser peligrosa (es parte del equilibrio de la naturaleza) sin embargo, desde la Revolución Industrial, su producción ha ascendido vertiginosamente: entre 1850 y 1990 la presencia de plomo, cobre y zinc se multiplicó por diez, con el correspondiente incremento de emisiones que ello conlleva.

La actividad humana ha contribuido notablemente al aumento de los niveles de metales en las aguas, sedimentos, flora y fauna, tanto marinas como epicontinentales. La presencia de elevadas concentraciones de metales en el medio provoca efectos adversos sobre el medio ambiente y la salud humana. Tal es el caso de la *enfermedad de Minamata*, provocada por un exceso de mercurio.

La concentración de metales en la columna de agua es, generalmente, baja; por el contrario, estos elementos se acumulan en los sedimentos y en organismos acuáticos, alcanzándose niveles importantes. En zonas especialmente contaminadas, el contenido de metales en animales y plantas alcanza valores que pueden resultar tóxicos para los organismos, los cuales resultan ser un foco de contaminación para el hombre, como consecuencia de su consumo.

Por todo ello, la contaminación progresiva del medio hídrico por metales pesados y los efectos perjudiciales que ésta produce en la biota han dado lugar a la necesidad de determinar la concentración de metales en diversas muestras acuáticas.

Desde el punto de vista de la Oceanografía Química, dado que las concentraciones de metales en agua natural suelen encontrarse a niveles inferiores a 50 nM, éstos se incluyen dentro del grupo conocido como elementos trazas, los cuales, a pesar de sus bajos niveles de concentración, poseen importantes implicaciones a nivel químico y biológico en los sistemas acuáticos naturales.

I. El Cobre

Entre los metales más abundantes, de amplia distribución y que presentan toxicidad a ciertos niveles para los organismos acuáticos, se encuentra el cobre.

El cobre es un elemento que se encuentra en todos los organismos como microcomponente. Es necesario para el metabolismo normal de muchos organismos vivos. Su presencia en animales y plantas se detectó hace 150 años. Además, es un micronutriente esencial, necesario para las plantas a niveles muy bajos. Sin embargo, a valores altos resulta tóxico debido a su unión con la membrana celular, que impide el transporte a través de la pared de la célula [3].

En humanos, el contenido en cobre oscila entre 50 y 80 mg [4]. El metabolismo del cobre debe tener un control homeostático riguroso, debido a la proximidad entre dosis que producen estados deficitarios y de intoxicación.

La utilización del cobre como elemento con propiedades terapéuticas se ha producido desde los primeros tiempos de la medicina. Dadas sus propiedades bioquímicas, fue utilizado por alquimistas hindúes, egipcios y sirios como terapia. En el

siglo XX (años 20) se señaló su esencialidad en mamíferos y se demostró que tanto el cobre como el hierro son imprescindibles para la formación de la sangre en ratas. A partir de los años 50 se produjo un rápido desarrollo del conocimiento de las funciones del cobre, y en la actualidad se le conoce como cofactor de más de 30 enzimas [4].

En aguas naturales, el cobre es un elemento que se encuentra a nivel de trazas. La concentración de cobre en mar abierto se encuentra en el rango 0,0063 – 2,8 µg/L, con un valor medio de 0,05 µg/L; mientras que en aguas costeras, bahías y estuarios puede oscilar entre 0,0069 – 20,0 µg/L. En sistemas fluviales estos niveles son algo superiores con niveles entre 0,5 – 200 µg/L [5]. Como es lógico, la cantidad de metal que puede ser medida en distintas zonas marinas, variará enormemente en función de la localización y el tipo de fuentes originarias. Así pues, se conocen por ejemplo las vías de ingreso y las cantidades globales para este metal, expresadas en toneladas/año que acceden al Mar del Norte, considerado como uno de los mares que sufren más directamente la contaminación de origen antropogénico [2]:

- Ríos: 1300 toneladas al año.
- Atmósfera: 1200 toneladas al año.
- Vertidos directos: 600 toneladas al año.
- Dragados 1000 toneladas al año.

Las precipitaciones atmosféricas contribuyen a la presencia de metales en mayor medida de la que se suponía, lo que hace que hoy se considere a la atmósfera como una importante vía de ingreso de metales, sobre todo en el mar. Los valores de transferencia de cobre desde la atmósfera a la superficie de agua marina (en ng/cm²/año) correspondiente al Mar del Norte, Mar Mediterráneo, Atlántico Sur y Pacífico Norte son respectivamente: 1300, 96, 220 y 9 [2]. Existen grandes diferencias entre las distintas zonas marítimas y, a pesar de que no se conocen suficientemente las tasas de lluvia que condicionan estrechamente la deposición húmeda, tales diferencias se pueden imputar a la actividad industrial y urbana de distintas zonas.

La exposición de especies acuáticas al cobre puede provocar la muerte u otros efectos adversos como reducción del crecimiento o debilitamiento de la reproducción, puesto que afecta a sistemas múltiples interfiriendo en procesos bioquímicos específicos (enzimas) y/o membranas celulares o de orgánulos.

Es por ello que este trabajo se basa en la preconcentración y determinación del cobre en aguas naturales para su aplicación en el control de la contaminación por este metal.

II. Métodos de determinación de cobre: Extracción en fase sólida

El análisis de trazas de metales, a nivel de nanomoles, en muestras de aguas naturales requiere métodos analíticos de elevada sensibilidad y selectividad. La espectrometría de absorción atómica con llama o con horno de grafito se utiliza con frecuencia en la determinación de metales pesados. Sin embargo, su sensibilidad puede ser insuficiente cuando se trata de algunas muestras ambientales con subtrazas metálicas [6]. Además, su aplicabilidad se ve reducida cuando la matriz es muy compleja. Como consecuencia, se suele utilizar como paso previo al análisis la preconcentración del analito y la eliminación de la matriz. Por ello, las técnicas de separación y preconcentración se convierten en piezas claves en este tipo de metodología.

Las técnicas de separación abarcan un amplio espectro que se extiende desde los simples procesos de precipitación, destilación, extracción,... hasta las más avanzadas técnicas cromatográficas. Todas ellas se basan en diferentes fundamentos físico-químicos, pero tienen en común la transferencia de masa que se realiza entre, al menos, dos fases distintas. De esta manera, se consigue alcanzar una mayor selectividad en la separación y sensibilidad en la determinación.

La extracción en fase sólida constituye una técnica de preconcentración ampliamente utilizada para el aislamiento de determinados analitos y la simplificación de la matriz en muestras con propiedades desfavorables para el análisis directo. La extracción suele llevarse a cabo utilizando un lecho adsorbente particulado que se encuentre dentro de columnas de pequeña longitud (usualmente llamados “cartuchos”) o bien inmovilizado en forma de disco. En ambas técnicas el analito se transfiere desde una fase móvil (gas o líquido) a una fase sólida, donde quedará retenido. Posteriormente el analito se recupera mediante elución de un líquido o mediante desorción térmica en el caso de que la fase móvil sea un gas [7].

La extracción en fase sólida (SPE) ha recibido una gran atención recientemente con la finalidad de analizar concentraciones trazas de metales. Esta técnica reduce el consumo de reactivos y disolventes, así como su exposición a la contaminación, el coste

y el tiempo de análisis [8, 9]. Los principales objetivos de la SPE son la preconcentración de metales, la simplificación de la matriz de la muestra y el intercambio de medio (debido a la transferencia del analito desde la matriz de la muestra a un disolvente diferente o a una fase gaseosa).

Esta técnica de preconcentración se desarrolló inicialmente como complemento a la extracción líquido-líquido. Hoy en día es la técnica comunmente más utilizada en diversas áreas de la Química, como pueden ser la ambiental, farmacéutica, clínica, alimentación e industria [10]. La extracción líquido-líquido convencional es muy laboriosa, difícil de automatizar y presenta serios problemas, como la formación de emulsiones. Además, consume grandes volúmenes de disolventes de alta pureza y, por tanto, requiere una disposición económica bastante alta. En contraposición a esta técnica, la extracción en fase sólida requiere unos costes menores, tiempos de análisis más cortos, menor consumo de disolventes y procedimientos más simples.

La preconcentración de muestras líquidas mediante SPE comenzó a desarrollarse ampliamente en los laboratorios a partir de 1980, con la introducción de columnas de sílice. Posteriormente, en 1989, se introdujo la tecnología de discos, que actualmente compite con la anterior [11]. Las columnas con diámetros internos reducidos limitan la velocidad de flujo a 1-10 mL/min, con lo cual se requieren tiempos bastante amplios para la preconcentración de muestras de grandes volúmenes. Además, las muestras con materia particulada pueden obstruir el cartucho y producir canalizaciones preferentes por las que eluya el analito [12]. Los discos fueron desarrollados en un principio para prevenir estos problemas y proporcionar mayores velocidades de proceso cuando se utilizaban volúmenes grandes de muestra. Además minimizaban la existencia e interferencias de partículas suspendidas y otros componentes de la matriz [13-15].

En general, los discos para la extracción en fase sólida pueden utilizarse como tales en aparatos de filtración para volúmenes grandes de muestras o bien formando parte de jeringuillas y columnas para la extracción de muestras de medio y pequeño volumen [16, 17]. Los tipos de formatos que existen se detallan en la Figura 1.

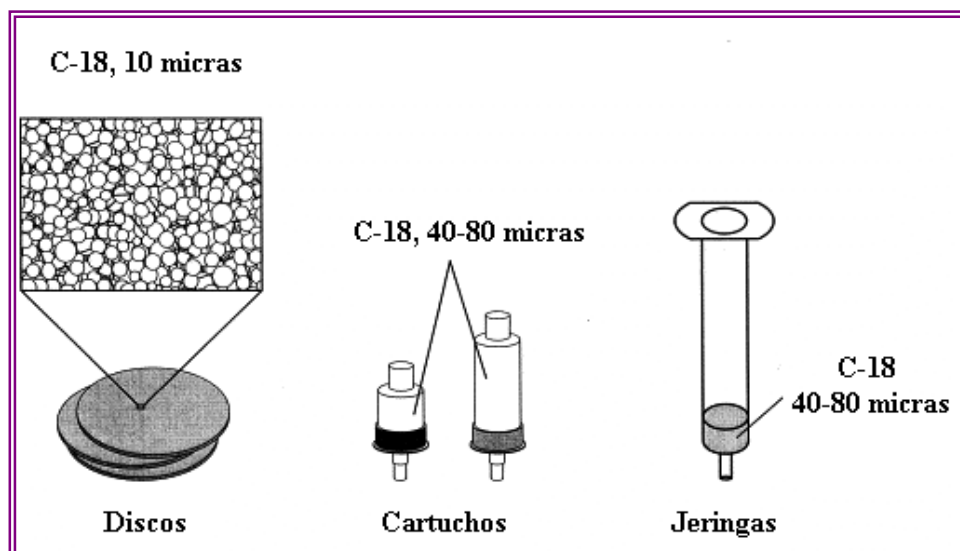


Figura 1. Usos de los discos para extracción en fase sólida

A pesar de que cuentan con una tecnología similar, existen varias diferencias entre las columnas y los discos que se pueden resumir de la siguiente manera:

- Las columnas pueden prepararse fácilmente en el laboratorio, mientras que los discos únicamente se fabrican de forma industrial. Por lo tanto, los discos solo están disponibles en un limitado número de adsorbentes y son menos económicos que las columnas.
- Por el contrario, los discos ofrecen ciertas ventajas que favorecen su uso en determinadas aplicaciones tales como su aplicación para muestras de grandes volúmenes que contengan material particulado en suspensión, donde los discos funcionan mejor que las columnas ya que evitan que se produzcan obstrucciones y canalizaciones preferentes. Además, proporcionan tiempos de proceso más cortos debido al mayor entrecruzamiento entre sus fibras. Esto es importante en programas de monitorización medioambiental, como por ejemplo, en el análisis de sustancias tóxicas o persistentes en aguas naturales que contienen frecuentemente una gran cantidad de materia particulada.
- Los discos proporcionan una gran superficie de retención, lo que facilita su uso en los análisis pasivos, en los que se sumerge el disco en la muestra, en lugar de pasar ésta a través del disco. Esta técnica puede utilizarse tanto en aplicaciones de campo como en los laboratorios, pero apenas se lleva a cabo dado el bajo equilibrio que existe en el proceso de extracción, incluso en muestras agitadas.

- Debido al bajo empaquetamiento que existe en las columnas, se debe utilizar más cantidad de adsorbente para evitar que la retención del analito se reduzca en el caso de que se obstruya la columna y se produzcan canalizaciones. El incremento en la masa de adsorbente produce una disminución en la especificidad de absorción y produce extractos más sucios.
- Los discos contienen más partículas y caminos más tortuosos, lo que indica que existe una mayor superficie disponible y la cinética de adsorción es mucho más rápida que en los cartuchos. Esta diferencia de tamaño de partícula en los discos y en columnas se muestra en la Figura 2.

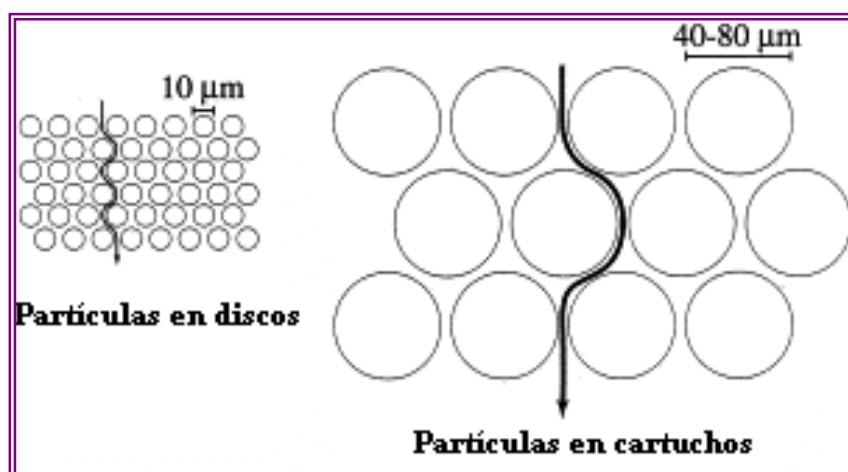


Figura 2. Diferencia en el tamaño de partícula en discos y columnas

En la bibliografía se detallan diversas investigaciones sobre extracción en fase sólida en las que se comparan los resultados obtenidos en análisis con discos y columnas [18]. En estos estudios, se llega a la conclusión de que se obtienen peores blancos utilizando columnas puesto que la materia orgánica de la muestra es capaz de adsorberse en las paredes y eluirse posteriormente.

Hoy en día los discos para SPE están disponibles en diferentes tamaños y composición. Existen membranas formadas por partículas de 8 a 12 µm de diámetro, que actúan como adsorbentes y que se encuentran inmovilizadas en una malla de fibras constituidas por poli(tetrafluoroetileno) (PTFE). Estas fibras se preparan en discos de

0,5 mm de espesor y con diámetros de 4 a 96 mm. El 90 % del peso de estos discos es el adsorbente. Estas membranas también están disponibles en cartuchos, en cuyo caso el lecho de material adsorbente está constituido por partículas de un tamaño aproximado de 50 μm colocadas en un disco de 1 mm de grosor, que se encuentra en la base de una jeringuilla. La superficie superior de estos discos está formada por polipropileno, que produce una prefiltración de la muestra antes de que ésta llegue al interior del disco [19].

II.1. Tipos de adsorbentes y selección adecuada de discos

Los adsorbentes más comunes incluyen octadecil sílice y octil sílice y polímeros porosos de estireno-divinilbenceno (ambos utilizados directamente o modificados con iones intercambiadores), carbón activo y éteres coronas inmovilizados. También se pueden utilizar mezclas de adsorbentes de diferente naturaleza.

A la hora de seleccionar un tipo de adsorbente para una determinada aplicación, los parámetros de interés son el tamaño del disco, la capacidad de adsorción y la cantidad de muestra que es capaz de soportar antes de que se sature. Los discos de gran diámetro son utilizados para volúmenes de muestras grandes con el fin de mejorar el paso de la muestra a través del disco. Aquéllos que tienen un diámetro menor se utilizan para muestras de pequeños volúmenes y para recuperar analitos que se encuentran disueltos en pequeñas cantidades de disolventes. De esta manera, se elimina la necesidad de evaporar el disolvente antes del análisis. En general, los diámetros pequeños se usan frecuentemente en análisis clínicos, forenses y farmacéuticos, mientras que los diámetros mayores se utilizan en análisis medioambientales.

Los mismos adsorbentes que se manejan convencionalmente en la extracción en fase sólida son los que se usan para extracción con discos. En la actualidad, estos discos se utilizan para un estrecho rango de aplicaciones y por ello, existen pocos tipos de adsorbentes comerciales. La descripción de los más utilizados y las aplicaciones descritas en la bibliografía se han recogido en la Tabla 1.

Tabla 1. Tipos de adsorbentes y aplicaciones

Adsorbente	Aplicaciones generales
Octadecil sílice (C18) y octil sílice (C8)	C18 es un adsorbente no específico (y por tanto, su uso es más amplio que el de C8). Se utilizan en la extracción de pesticidas, herbicidas, aditivos, compuestos farmacéuticos, hidrocarburos, etc., todos ellos no polares o moderadamente polares.
Poliestireno divinilbenceno	Se utiliza para compuestos que no pueden extraerse en C18 por su alta solubilidad en agua: pesticidas y herbicidas polares, fenoles y compuestos farmacéuticos polares. Si los polímeros se encuentran sulfonados, acetilados o hidroximetilados, proporcionan una alta recuperación de compuestos polares neutros.
Carbón activo	Sus aplicaciones son similares a las de poliestireno divinilbenceno pero su uso es menos frecuente. Pueden extraer herbicidas triazinas, algunos pesticidas polares y N-nitroso-dialquilaminas.
Adsorbentes mixtos	El adsorbente octadecil sílice enlazado a grupos de ácido bencenosulfónico se utiliza en toxicología para el aislamiento de drogas y sus metabolitos, como por ejemplo los derivados de marihuana y cocaína, anfetaminas y opiáceos en fluidos biológicos.
Iones intercambiadores (ácido sulfónico y aminas cuaternarias)	Extraen herbicidas ácidos y pesticidas en agua, así como drogas básicas en fluidos biológicos.
Éteres corona	Aíslan metales preciosos (Pd, Pt, Rh) y radionúcleos (Cs, Sr, Pb). También recuperan impurezas metálicas (Bi, Sb, Fe, Pb, Bi, Cu, Hg) de vertidos de refinerías.

Existe una metodología algo más compleja que se basa en apilar discos que contengan distintos adsorbentes con el objetivo de recuperar, en una única elución, varios analitos. De este modo, se pueden extraer muestras complejas que contengan compuestos de diferente polaridad o capacidad de ionización, a la vez que se reducen las interferencias debido a que en uno de los discos se producirá la adsorción selectiva de la matriz y en otro, la adsorción del analito.

Para la extracción de metales pesados en aguas naturales se suelen utilizar los discos de C18 y poliestireno divinilbenceno. Dado que los metales, por lo general, no interaccionan directamente con dichos adsorbentes, es necesario recurrir a reactivos orgánicos con las propiedades citadas en la tabla anterior, para que queden retenidos en los discos y que posteriormente complejen al metal analizado.

Actualmente, algunos de estos discos, especialmente los de C18, se están comenzando a utilizar con éxito para la separación y determinación de iones metálicos tanto en suelos como en aguas naturales y potables. [20-25].

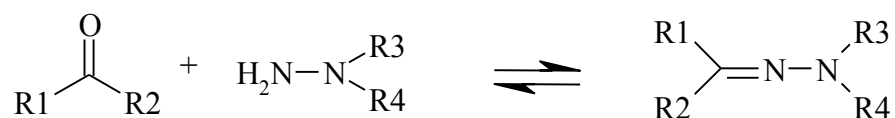
La metodología que se ha desarrollado en esta memoria para la preconcentración de metales trazas en aguas naturales y su posterior determinación es, por tanto, la Extracción en Fase Sólida, utilizando discos de membrana y la Espectrometría de Absorción Atómica con llama como sistema de detección. Para favorecer la retención de los metales se estudió la inmovilización de diversos reactivos orgánicos en el disco de SPE.

II. 2. Aplicabilidad de las hidrazonas en extracción en fase sólida con discos de membrana

Una vez que ha sido introducido el método de análisis que se va a emplear para realizar la determinación de Cu(II), se estudió la posibilidad de aplicar algún compuesto de la familia de las hidrazonas para favorecer la retención metálica en los discos de membrana. Estos reactivos son ligandos con propiedades quelatantes muy interesantes y potencialmente muy útiles en este tipo de metodologías.

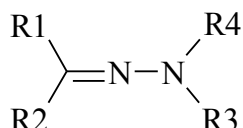
Estos reactivos orgánicos se sintetizan mediante una reacción de condensación entre un compuesto carbonílico y una hidracida, por calentamiento a reflujo de

cantidades equimoleculares de ambos, previamente disueltos en un disolvente adecuado según la siguiente reacción:



La hidrazona precipita durante el proceso de calefacción o, generalmente, cuando se enfría la disolución resultante. Es frecuente realizar la recristalización del precipitado, empleando para ello un disolvente apropiado [26, 27].

Las hidrazonas son azometinos caracterizados por la presencia de una agrupación triatómica C=N-N y se representan de la forma siguiente:



donde R₁, R₂, R₃ y R₄ representan la existencia de cuatro radicales. El átomo de nitrógeno del grupo azometino (C=N) recibe el nombre de nitrógeno imínico y el inmediatamente posterior se denomina nitrógeno amínico [28].

La facilidad de síntesis y la elevada reactividad que presentan las hidrazonas ha hecho posible su aplicación en numerosos campos.

En el campo de la medicina, puede señalarse su utilización como agentes antitumorales [29 - 32], antivirales [29], antibacterianos [33] y antimicrobianos [34, 35]. Además se han aplicado para el tratamiento de la tuberculosis [36], leucemia y enfermedades mentales. Asimismo, las hidrazonas son empleadas para la determinación de diversos compuestos que forman parte de ciertos fármacos [37-40], así como de productos cosméticos [41]. Del mismo modo, las hidrazonas son aplicadas habitualmente en la agricultura, utilizándose como componentes de diversos plaguicidas o como agentes reguladores del crecimiento de algunas plantas [42]. Las hidrazonas han sido utilizadas igualmente en estudios medioambientales, concretamente para la determinación y control en el aire de compuestos orgánicos que pueden llegar a ser importantes contaminantes atmosféricos, tales como aldehídos y cetonas [43],

acetaldehído [44, 45], formaldehído [46, 47], o para la determinación de compuestos fenólicos [48, 49] y aminocetonas [48] que pueden estar presentes en aguas residuales .

Entre otras aplicaciones, y concretamente dentro del campo de la Química Analítica, han sido empleadas para la detección y determinación de iones metálicos. En este último aspecto, se aprovecha la tendencia de las hidrazonas para formar quelatos coloreados con iones metálicos, generalmente con los metales de transición. Estos quelatos presentan una alta absortividad molar y son fácilmente extraíbles en disolventes orgánicos inmiscibles en agua. La hidrazona, que actúa como ligando multidentado, puede coordinarse a los metales a través de uno de los átomos de nitrógeno o en combinación de uno de éstos y algún átomo electronegativo tal como el azufre o el oxígeno. Los quelatos metálicos originados, en general, son determinados posteriormente por técnicas espectroscópicas de absorción molecular o de fluorescencia molecular, según las características del complejo metálico.

Dependiendo de la naturaleza de sus sustituyentes, pueden distinguirse varios tipos de hidrazonas. Estos sustituyentes pueden ser: protones, radicales alquilo, radicales arilo, radicales acilo, radicales O-alquilo, radicales O-arilo, así como dióxido de nitrógeno o halógenos.

Las aroilhidrazonas son un subgrupo de hidrazonas que se caracterizan por tener un radical aroilo unido al nitrógeno amínico ($>C=N-NH-CO-Ar$). La presencia de un grupo carbonilo, en posición contigua a la agrupación triatómica fundamental de toda hidrazona ($>C=N-N<$), confiere a estas moléculas unas características especiales, ya que este grupo está dotado de electrones y tiene una gran capacidad para formar quelatos metálicos. De esta forma, las aroilhidrazonas muestran un variado comportamiento como ligando, que depende de las posiciones de coordinación que presenten, pudiendo actuar como ligandos bidentados, tridentados, tetradentados o pentadentados formando complejos coloreados, principalmente con los metales de transición.

Entre las aroilhidrazonas, especial atención merecen las saliciloilhidrazonas, en las que el radical arilo de la aroilhidrazona es un grupo fenólico en posición orto que puede participar también en la coordinación. Debido a que forman complejos con numerosos iones metálicos, las saliciloilhidrazonas se han empleado extensamente en métodos de determinación espectrofotométricos y espectrofluorimétricos, habiéndose estudiado

además la potencialidad de estos compuestos como agentes de preconcentración de trazas metálicas por extracción líquido-líquido.

De todos ellos, y como se detalla en la parte experimental de esta memoria, se seleccionó una aroilhidrazona para ser inmovilizada en los discos de membrana, la **saliciloilhidrazona del piridoxal** o la **piridoxal saliciloilhidrazona (PSH)**, y estudiar su aplicabilidad en la preconcentración de trazas de Cu (II) en aguas naturales.

Los primeros estudios realizados sobre la *saliciloilhidrazona del piridoxal* datan del principio de los años ochenta y fueron llevados por M. Valcarcel y colaboradores, que realizaron por primera vez su síntesis y describieron sus propiedades analíticas [51].

La síntesis de la *saliciloilhidrazona del piridoxal* se realiza mediante calentamiento a reflujo de una mezcla equimolecular de saliciloilhidracida (1 g en 20 ml de etanol) y piridoxal (1,1 g en 20 ml de agua destilada), durante 10 minutos (ver Figura 3). La mezcla se deja a temperatura ambiente. El precipitado filtrado de color amarillo, se recrystaliza dos veces en etanol. El producto obtenido tiene un punto de fusión de 247 °C y el rendimiento de esta síntesis es del 80%.

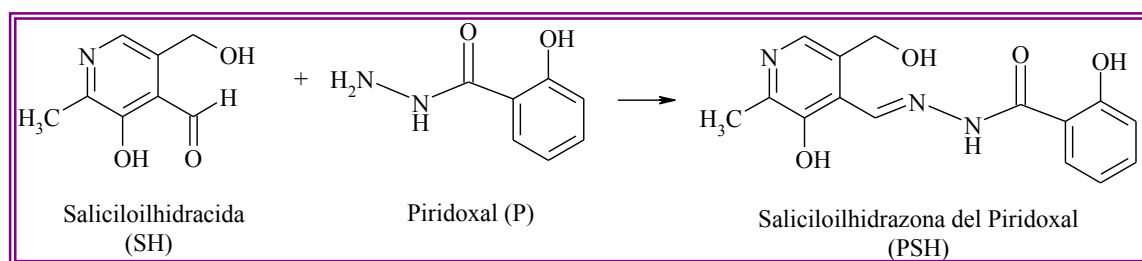


Figura 3. Síntesis de la PSH

El análisis elemental del compuesto sintetizado por estos autores fue: C 55,3%, H 5,0%, N 13,4%, O 26,3%, mientras que los valores calculados a partir de la fórmula molecular $C_{15}H_{15}N_3O_4 \cdot H_2O$ fueron: C 56.4%, H 5,3%, N 13,2%, O 25,1% [51].

Los datos obtenidos para el análisis elemental de la PSH en estado sólido hacía suponer que el reactivo en estado sólido posee una molécula de agua asociada al grupo $>C=O$, circunstancia que se confirmaría posteriormente con el estudio del espectro de IR, y que era eliminada tras el secado del sólido obtenido durante 1 hora a 110°C.

La *saliciloilhidrazona del piridoxal* es poco soluble en los disolventes orgánicos más comúnmente usados en las determinaciones fotométricas, tales como metanol, etanol, tetracloruro de carbono, cloroformo, alcohol amílico, nitrobenceno y benceno. Sin embargo, en dimetilformamida y dimetilsulfóxido es soluble (Tabla 2).

Tabla 2. Solubilidad de PSH en distintos disolventes

Disolvente	Solubilidad (g/L)
Agua	0,6
Metanol	1,1
Etanol	0,9
Tetracloruro de carbono	0,6
Cloroformo	0,7
Nitrobenceno	0,8
Alcohol Amílico	1,0
Benceno	0,8
Dimetilformamida	Mayor de 10

Los máximos de absorción de los espectros moleculares UV-VIS de la PSH en disolución con diferentes disolventes se recogen en la Tabla 3, así como los coeficientes de absortividad molar evaluados para cada disolvente [51].

Tabla 3. Máximos de absorción y coeficientes de adsortividad molar

Disolvente	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\epsilon_{\text{máx}}$ (L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹)
Agua	300	14800
Etanol	300	20900
Alcohol butílico	300	21700
Alcohol amílico	310	19600
Cloroformo	300	19700
Dioxano	300	20000
Dimetilformamida	320	17500
Acetona	340	15100
MIBK	340	14900

Las constantes de ionización en medio acuoso a una fuerza iónica de 0,05 M están descritas en la bibliografía, y fueron determinadas por un método simultáneo potenciométrico-fotométrico, encontrándose unos valores medios de las constantes de

ionización de $4,0 \pm 0,1$ para pK_1 y de $7,9 \pm 0,1$ para pK_2 [51]. La primera constante de ionización puede atribuirse a la desprotonación del nitrógeno piridínico, el segundo pK corresponde a la ionización de los grupos $-OH$ que posee el reactivo.

De igual forma se encuentra descrita la estabilidad de la *saliciloilhidrazona del piridoxal*, frente a los principales oxidantes y reductores a diferentes valores de la escala de pH, destacando que los agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno o el peroxidisulfato de potasio en concentraciones moderadas no afectan de manera apreciable al espectro de absorción de la PSH en disolución acuo-orgánica durante varias horas. Sin embargo los agentes reductores, como la hidracina o la hidroxilamina, afectan fuertemente al reactivo en medio alcalino, pero no en medio ácido [51].

El estudio de reaccionabilidad de la PSH con los iones metálicos es de gran importancia, de tal forma que está descrita la reacción de la PSH con 40 iones metálicos, a una concentración de $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, a un pH de 1,5-2 (HCl), 4,7 (tampón acetato) y 10,2 (tampón amonio). Las características espectrales de los principales complejos solubles (todos ellos de color amarillo o naranja) a pH ácido se muestran en la Tabla 4. Todos los máximos de absorción aparecen en el intervalo de longitudes de onda de 390 a 490 nm [51]. Puede concluirse que este reactivo presenta una reaccionabilidad muy amplia. Con los cationes Cu(II), Ni(II), Co(II) y Fe(II) presenta una sensibilidad apreciable en tampón acético-acetato, mientras que con Al(III), Zr(IV) y Ti(IV) presenta mayor sensibilidad a pH ácido [51].

Tabla 4. Complejos solubles con PSH y características espectrales

pH=1,5-2,0 (HCl)			pH=4,7 (Tampón acetato)		
Metal	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\epsilon_{\text{máx}} (\times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$	Metal	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\epsilon_{\text{máx}} (\times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$
Cu(II)	420	15,8	Cu(II)	390	17,4
Mo(VI)	420	2,4	Fe(II)	420, 490	12,6; 7,0
V(V)	410	4,6	U(VI)	425	6,0
Zr(IV)	405	27,4	Ti(IV)	450	1,8
U(VI)	390	3,0	Al(III)	425	29,7
Ti(IV)	390; 440	5,9; 3,6	Ga(III)	425	10,4
Al(III)	420	20,3	Ni(II)	425	22,0
Ga(III)	420	2,8	Co(II)	420	13,3

La *saliciloilhidrazona del piridoxal* ha sido aplicada en Química Analítica como reactivo espectrofluorimétrico y espectrofotométrico. De este modo se ha empleado en la determinación espectrofotométrica y espectrofluorimétrica de Al(III) y en la determinación espectrofotométrica de Zr(IV).

En el campo de la medicina la *saliciloilhidrazona del piridoxal* se ha estudiado por su capacidad quelatante como agente para la terapia oral de las enfermedades debidas a una sobrecarga de hierro [52]. Asimismo la PSH ha sido considerada como un análogo de la *piridoxal isonicotinoil hidrazona*, por ser un efectivo quelatante del Fe(III), y por tanto por su potencial para tratar las enfermedades debidas a una sobrecarga de hierro. La actividad biológica de estos compuestos se relacionó con sus liposolubilidades, medidas por sus coeficientes de partición o reparto entre n-octanol y agua [53-55].

Por todo ello, se puede concluir que la PSH presenta características complejantes muy adecuadas para estudiar su potencial uso como reactivo inmovilizado en discos de membrana para la preconcentración por extracción en fase sólida de diversos metales de interés medioambiental.

Material y Método

MATERIAL Y MÉTODO

III. Reactivos y disoluciones

A continuación se exponen los reactivos y las disoluciones preparadas durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

III.1. Reactivos

- Acetonitrilo (CH_3CN): PA, Panreac, España.
- Ácido acético glacial 100% (CH_3COOH): PA, Merck, Alemania.
- Ácido clorhídrico fumante 37% (HCl): PA, Merck, Alemania.
- Ácido nítrico 65% (HNO_3): PA, Merck, Alemania.
- Cloroformo (CHCl_3): PA, Merck, Alemania.
- Disoluciones patrón de:
 - 1000 mg/L de cadmio (II) ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$) en HNO_3 0,5 mol/L: Merck, Alemania.
 - 1000 mg/L de cobalto (II) ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2$) en HNO_3 0,5 mol/L: Merck, Alemania.
 - 1000 mg/L de cobre (II) ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$) en HNO_3 0,5 mol/L: Merck, Alemania.
 - 1000 mg/L de níquel (II) ($\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$) en HNO_3 0,5 mol/L: Merck, Alemania.
 - 1000 mg/L de plata (I) ($\text{Ag}(\text{NO}_3)$) en HNO_3 0,5 mol/L: Merck, Alemania.
 - 1000 mg/L de plomo (II) ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) en HNO_3 0,5 mol/L: Merck, Alemania.
- Etanol 96% ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$): Panreac, España.
- Hidrocloruro de piridoxal ($\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$): para síntesis, Aldrich, Estados Unidos.
- Hidróxido sódico (NaOH): PA, Merck, Alemania.
- Metanol: PA, Merck, Alemania.
- Saliciloilhidrazida ($\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2$): para síntesis, Sigma, Estados Unidos.

III.2. Disoluciones

- Disolución de HNO_3 0,1 M: se disuelven 700 μL de HNO_3 al 65% en agua desionizada Milli-Q y se enrasa a un volumen de 100 mL.
- Disolución de HNO_3 0,5 M: se disuelven 3,5 mL de HNO_3 al 65% en agua Milli-Q y se enrasa a un volumen de 100 mL.
- Disolución de HNO_3 1 M: se disuelven 7 mL de HNO_3 al 65% en agua Milli-Q y se enrasa a un volumen de 100 mL.

- Disolución de HNO_3 2 M: se disuelven 14 mL de HNO_3 al 65% en agua Milli-Q y se enrasa a un volumen de 100 mL.
- Disolución CH_3COOH 0,5 M: se disuelven 2,85 mL de CH_3COOH al 100% en agua Milli-Q y se enrasa a un volumen de 100 mL.
- Disolución CH_3COOH 1 M: se disuelven 5,7 mL de CH_3COOH al 100% en agua Milli-Q y se enrasa a un volumen de 100 mL.
- Disolución CH_3COOH 2 M: se disuelven 11,4 mL de CH_3COOH al 100% en agua Milli-Q y se enrasa a un volumen de 100 mL.
- Disolución de HCl 0,5 M: se disuelven 4,15 mL de HCl al 37% en agua Milli-Q y se enrasa a un volumen de 100 mL.
- Disolución de HCl 1 M: se disuelven 8,3 mL de HCl al 37% en agua Milli-Q y se enrasa a un volumen de 100 mL.
- Disolución de HCl 2 M: se disuelven 16,6 mL de HCl al 37% en agua Milli-Q y se enrasa a un volumen de 100 mL.
- Disolución de cadmio de concentración 20 ppm: se disuelven 2 mL de disolución patrón de 1000 mg/L en agua Milli-Q y se enrasa a un volumen de 100 mL. A partir de ésta se prepararán estándares de 0,5; 1; 1,5 y 2 mg/L, enrasando con HNO_3 0,5 M. Estas disoluciones se utilizarán para realizar la recta de calibrado en el análisis por Espectroscopía de Absorción Atómica.
- Disolución de cobalto de concentración 20 ppm: se disuelven 2 mL de disolución patrón de 1000 mg/L en agua Milli-Q y se enrasa a un volumen de 100 mL. A partir de ésta se prepararán estándares de 0,5; 1; 1,5 y 2 mg/L, enrasando con HNO_3 0,5 M. Estas disoluciones se utilizarán para realizar la recta de calibrado en el análisis por Espectroscopía de Absorción Atómica.
- Disolución de cobre de concentración 20 ppm: se disuelven 2 mL de disolución patrón de 1000 mg/L en agua Milli-Q y se enrasa a un volumen de 100 mL. A partir de ésta se prepararán estándares de 0,5; 1; 1,5 y 2 mg/L, enrasando con HNO_3 0,5 M. Estas disoluciones se utilizarán para realizar la recta de calibrado en el análisis por Espectroscopía de Absorción Atómica.
- Disolución de níquel de concentración 20 ppm: se disuelven 2 mL de disolución patrón de 1000 mg/L en agua Milli-Q y se enrasa a un volumen de 100 mL. A partir de ésta se prepararán estándares de 0,5; 1; 1,5 y 2 mg/L, enrasando con HNO_3 0,5 M. Estas disoluciones se utilizarán para realizar la recta de calibrado en el análisis por Espectroscopía de Absorción Atómica.

- Disolución de plata de concentración 20 ppm: se disuelven 2 ml de disolución patrón de 1000 mg/L en agua Milli-Q y se enrasa a un volumen de 100 mL. A partir de ésta se prepararán estándares de 0,5; 1; 1,5 y 2 mg/L, enrasando con HNO_3 0,5 M. Estas disoluciones se utilizarán para realizar la recta de calibrado en el análisis por Espectroscopía de Absorción Atómica.
- Disolución de plomo de concentración 20 ppm: se disuelven 2 ml de disolución patrón de 1000 mg/L en agua Milli-Q y se enrasa a un volumen de 100 mL. A partir de ésta se prepararán estándares de 0,5; 1; 1,5 y 2 mg/L, enrasando con HNO_3 0,5 M. Estas disoluciones se utilizarán para realizar la recta de calibrado en el análisis por Espectroscopía de Absorción Atómica.
- Disolución de NaOH 0,1 M: se prepara una disolución intermedia de 2 M disolviendo 8 g de hidróxido sódico en agua Milli-Q. Una vez atemperada la disolución se enrasa a un volumen de 100 mL. A partir de ésta y por dilución, se prepara la de NaOH 0,1 M.
- Disolución de NaOH 8 M: se pesan 32 g de NaOH y se disuelven en una cantidad suficiente de agua Milli-Q. Finalmente, se enrasa hasta 100 mL.
- Disolución de NaOH 10 M: se pesan 40 g de NaOH y se disuelven en una cantidad suficiente de agua Milli-Q. Finalmente, se enrasa hasta 100 mL.
- Disolución tampón acético-acetato de pH 3,5 (4 M): se pesan 24 g de ácido acético glacial, se le añaden 25 mL de agua Milli-Q y el volumen suficiente de NaOH 8 M para ajustar el pH a 3,5. Luego, se enrasa con agua Milli-Q hasta 100 mL.
- Disolución tampón acético-acetato de pH 4 (4 M): se pesan 24 g de ácido acético glacial, se le añaden 25 mL de agua Milli-Q y el volumen suficiente de NaOH 8 M para ajustar el pH a 4. Luego, se enrasa con agua Milli-Q hasta 100 mL.
- Disolución tampón acético-acetato de pH 4 (8 M): se pesan 48 g de ácido acético glacial, se le añaden 25 mL de agua Milli-Q y el volumen suficiente de NaOH 8 M para ajustar el pH a 4. Luego, se enrasa con agua Milli-Q hasta 100 mL.
- Disolución tampón acético-acetato de pH 4,6 (4 M): se pesan 24 g de ácido acético glacial, se le añaden 25 mL de agua Milli-Q y el volumen suficiente de NaOH 8 M para ajustar el pH a 4,6. Luego, se enrasa con agua Milli-Q hasta 100 mL.
- Disolución tampón acético-acetato de pH 5,7 (4 M): se pesan 24 g de ácido acético glacial, se le añaden 25 mL de agua Milli-Q y el volumen suficiente de NaOH 8 M para ajustar el pH a 5,7. Luego, se enrasa con agua Milli-Q hasta 100 mL.

- Disolución tampón acético-acetato de pH 4,5 (4 M): se pesan 240 g de ácido acético glacial, se le añaden 250 mL de agua Milli-Q y el volumen suficiente de NaOH 8 M para ajustar el pH a 4,5. Luego, se enrasa con agua Milli-Q hasta 1 L.

IV. Material e instrumentos utilizados

El material volumétrico de vidrio empleado en este trabajo de investigación es de clase A. En la Tabla 5 se muestran las precisiones correspondientes:

Tabla 5. Precisión del material de vidrio

Material	Error (mL)
Pipetas de 2 mL	$\pm 0,01$
Pipetas de 5 mL	$\pm 0,02$
Pipetas de 10 mL	$\pm 0,03$
Matraces aforados de 10 mL	$\pm 0,025$
Matraces aforados de 25 mL	$\pm 0,03$
Matraces aforados de 50 mL	$\pm 0,05$
Matraces aforados de 100 mL	$\pm 0,08$
Matraces aforados de 250 mL	$\pm 0,11$
Matraces aforados de 500 mL	$\pm 0,15$

Dado que se están analizando trazas metálicas, se requiere una estricta limpieza de todo el material que se utilice. El protocolo de limpieza consiste en las siguientes etapas:

1. El material se lava con agua y jabón, enjuagándose posteriormente con gran cantidad de agua.
2. Seguidamente se lava el material con pequeñas porciones de agua purificada por un proceso de ósmosis inversa (R.O.)
3. Se añaden pequeños volúmenes de agua purificada con un tratamiento de desionización (Milli-Q).
4. Se sumerge el material en HNO_3 2 M y se deja durante 3 días.
5. Se eliminan los restos de HNO_3 que hayan podido quedar en el material, enjuagándolo con abundante agua Milli-Q, al menos, 3 veces, y se deja secar.

Los instrumentos utilizados en la investigación se detallan a continuación:

- Equipo estándar de filtración de 47 mm de diámetro, Millipore. En las siguientes imágenes (Figura 4 y Figura 5) se detalla el esquema del montaje del equipo:

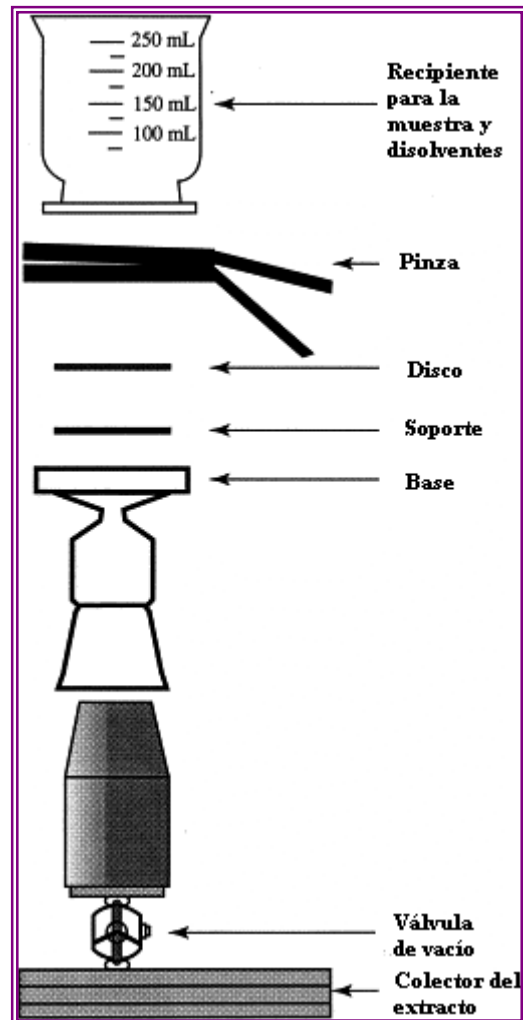


Figura 4. Esquema del equipo de filtración para la técnica de extracción en fase sólida con discos de membrana

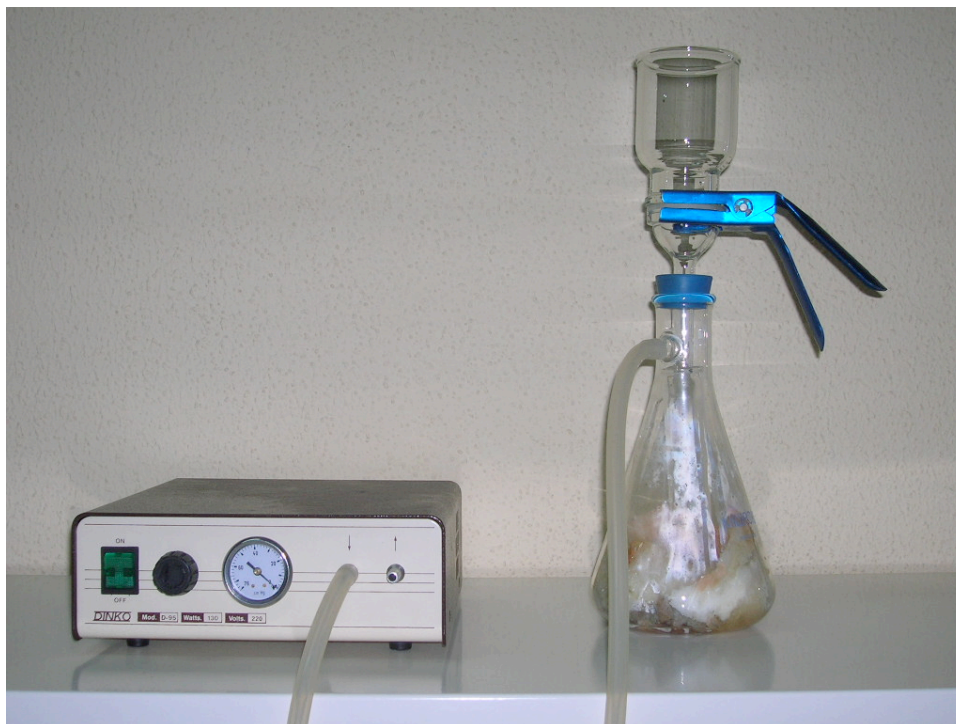


Figura 5. Imagen del sistema de extracción en fase sólida con discos de membrana

Consta de un recipiente de vidrio graduado, en el cual se vierten con cuidado las distintas disoluciones y la muestra; un soporte donde se coloca el disco SDB; una pinza que sujeta el recipiente de vidrio y el soporte; y un matraz kitasato que se acopla a la bomba de vacío a través de un tubo de C-Flex. Dentro del matraz se introduce un tubo colector de las disoluciones o extractos obtenidos después de que pasen a través del filtro.

- Balanza, AE 240, Mettler, España.
- Bomba de vacío, modelo D-95, DINKO, España.
- Espectrofotómetro, Novaspec II, Pharmacia Biotech, Suecia.
- Espectrómetro de Absorción Atómica, SOLAAR M Series, Unicam, Reino Unido.
- Estufa calefactora, Selecta España.
- pH-metro, micro pH 2001, equipado con un electrodo combinado de vidrio-Ag/AgCl modelo 52-02 y compensador de temperatura, Crison, España.
- Ultrasonido, Ultrasons P-Selecta, Selecta, España.

V. Método desarrollado

El objetivo de este trabajo de investigación es desarrollar y optimizar un método adecuado de preconcentración y determinación de trazas metálicas de Cu (II) en aguas naturales. Para ello, se utiliza la extracción en fase sólida con discos de poliestireno divinilbenceno (SDB) que contienen un 10% de PTFE, de 47 mm de diámetro y 0,5 mm de espesor, con un tamaño de poro de 80 Å, un tamaño de partículas de 16 µm y un área superficial de 450 m²/g. Estos discos son estables en el rango de pH 2-12 y son resistentes a la mayoría de disolventes orgánicos.

La extracción en fase sólida consta de 6 etapas esenciales: descontaminación, acondicionamiento, extracción de la muestra, secado, recuperación y lavado del disco.

Descontaminación

Después de colocar el disco en el aparato de filtración, se hacen pasar con ayuda de la bomba de vacío 5 mL de metanol para humedecerlo, 10 mL de HNO₃ 1 M, 10 mL de metanol 100% y 10 mL de acetonitrilo 99,5%. Todos estos disolventes o disoluciones eliminan los contaminantes procedentes del proceso de fabricación y del ambiente que pueda contener el disco.

Acondicionamiento

Tras secar el disco dejando pasar aire durante varios minutos, se introduce en el recipiente del aparato de filtración una disolución de reactivo disuelto en un volumen adecuado de disolvente. En el caso de la PSH es necesario utilizar metanol. En el caso de los otros dos reactivos que se han estudiado durante los análisis previos, la 2HBBH (2-hidroxibenzaldehído benzoilhidrazona) y la 2APBH (2-acetilpiridina benzoilhidrazona) se utiliza cloroformo, puesto que son más solubles en dicho disolvente.

La disolución de reactivo se deja pasar libremente, sin el uso de la bomba de vacío para que todo el contenido de reactivo quede retenido en el filtro. Una vez que el disolvente ha pasado a través del disco, éste se deja secar a temperatura ambiente el tiempo necesario para que se evapore el resto de disolvente.

Finalmente, el disco se lava con 25 mL de agua Milli-Q y se deja secar pasando aire.

De esta manera, el polímero SDB se encuentra modificado con el reactivo y acondicionado para el siguiente proceso, que será el de extracción de la muestra.

Extracción de la muestra

Antes de pasar la muestra, se humedece el disco con 25 mL de agua desionizada. Posteriormente, se hace pasar la muestra que contiene el metal a preconcentrar a una presión de 2 cm de Hg. De esta manera, se forma el complejo entre el metal y el reactivo que quedó retenido en el disco en la etapa anterior. Es importante que durante esta etapa el disco no se quede seco en ningún instante.

Secado

Una vez que haya pasado toda la muestra a través del disco, se aplica un alto vacío para eliminar los restos de disolución. Este paso es muy importante, porque el agua que quede retenida en el disco puede producir una dilución del eluyente posterior y reducir la eficiencia de la etapa de elución, especialmente en el caso de eluyentes parcialmente miscibles en agua.

Recuperación

El metal es recuperado pasando 10 mL de disolución de ácido que destruyen el complejo formado y permiten la elución del metal en un pequeño volumen. Este volumen de eluato es recogido en un tubo colector y será posteriormente analizado por Espectrometría de Absorción Atómica. Finalmente, se deja que el disco se seque totalmente haciendo pasar aire a vacío.

Lavado del disco

Esta última etapa es esencial para poder seguir utilizando el disco en otros análisis. Consta de 3 pasos: pasar 10 mL de HNO_3 1 M para eliminar los restos de metal que puedan haberse quedado retenidos, 10 mL de metanol para eliminar los posibles restos de reactivo y 10 mL de H_2O para eliminar los restos de ácido nítrico y metanol.

Finalmente, se deja secar completamente el disco dejando pasar aire a alto vacío. Este paso es muy importante ya que uno de los principales mecanismos de degradación de discos es la hidrólisis que se produce por el contacto de éstos con el agua. Si en algún caso se llegara a producir degradación, la hidrólisis se puede invertir calentando los discos en una estufa calefactora hasta que el agua que contienen se evapore.

Resultados y Discusión

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI. Ensayos preliminares

El objetivo central de este trabajo consiste en el desarrollo de un método de preconcentración y posterior determinación por Espectrometría de Absorción Atómica, de trazas de cobre en muestras acuosas para su aplicación en la detección de la contaminación por este metal en aguas naturales.

Para llevar a cabo el proceso de preconcentración se ha elegido un sistema de extracción en fase sólida por las características y ventajas que presenta frente a otros sistemas empleados con la misma finalidad y que se han descrito en la introducción de esta memoria.

La extracción en fase sólida constituye una técnica de preconcentración ampliamente utilizada para el aislamiento de determinados analitos y la simplificación de la matriz en muestras con propiedades desfavorables para el análisis directo. Esta técnica precisa de una membrana, en forma de disco, que contenga partículas adsorbentes que retenga el analito. Este proceso de adsorción se puede aplicar al análisis de trazas metálicas mediante una reacción de quelatación entre el metal y un ligando selectivo y sensible adecuado. Para ello, el ligando complejante, de naturaleza orgánica, debe quedar retenido previamente en dichas partículas. Cuando se produce el paso de la muestra con el analito, éste es complejado por el reactivo orgánico, reteniendo igualmente en la membrana y produciendo su preconcentración. Posteriormente, se utilizará un eluyente adecuado que sea capaz de romper el complejo reactivo-metal que se forma en la superficie del disco y que permita la determinación del metal preconcentrado. Por tanto, es de gran interés la búsqueda de reactivos selectivos y sensibles que sean aplicables a la preconcentración de metales traza de interés medioambiental.

VI.1. Elección de un reactivo orgánico

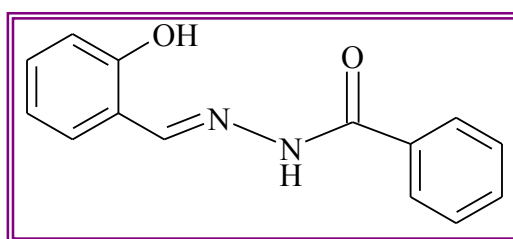
Las características que debe cumplir un reactivo orgánico para que sea aplicable mediante la técnica de preconcentración mediante extracción en fase sólida con discos de membrana en la preconcentración de metales trazas son las siguientes:

- Debe quedar retenido en el adsorbente que forme el disco. Por ello, se han seleccionado para este estudio discos “Empore” de octadecil sílice (C18) y de poliestireno divinilbenceno (SDB) con diferente polaridad, para poder estudiar la aplicabilidad de diversos reactivos orgánicos.
- Debe ser capaz de formar un complejo con el metal, que por sus características se quede retenido en el disco.
- La constante termodinámica de formación del complejo debe ser suficientemente alta para que se puedan obtener rendimientos adecuados en el proceso de preconcentración.
- La cinética de formación del complejo metálico debe ser relativamente alta para que mientras se haga pasar la muestra a través del filtro, el complejo se vaya formando a una velocidad tal que haga el método viable.

Así pues, se han realizado una serie de pruebas en las que se han probado 3 reactivos orgánicos diferentes del grupo de las hidrazonas, estudiándose su capacidad de retención en el disco y su reactividad con varios metales, con la finalidad de encontrar aquél que cumpla las condiciones adecuadas para poder desarrollar la técnica de preconcentración seleccionada.

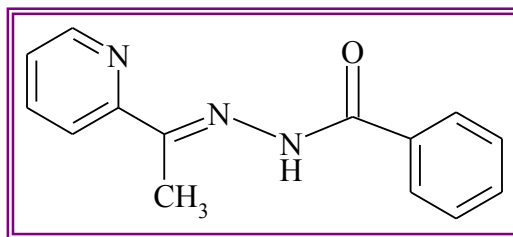
Estos 3 reactivos son los siguientes:

a) 2 HBBH: 2-hidroxibenzaldehido benzoilhidrazona

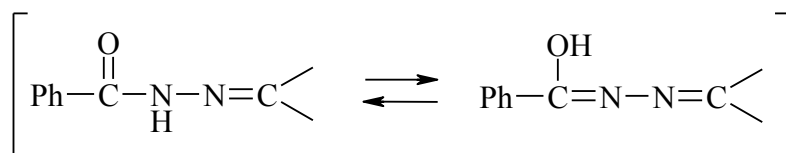


Esta benzoilhidrazona tiene un pK_1 de 6,77 y un pK_2 de 9,11. En medio neutro o ligeramente ácido es un ligando bidentado no cargado. El grupo hidroxilo de la molécula hace posible que la 2HBBH forme puentes de hidrógeno en disolución. En medio básico, este reactivo actúa como ligando tridentado cargado negativamente (con carga -1). Se ha estudiado su reactividad con Ni(II), Cu(II), Mn(II), Zn(II) y Co(II) y se ha demostrado que es capaz de formar complejos con ellos [56 - 58].

b) 2 APBH: 2-acetilpiridina benzoilhidrazona.

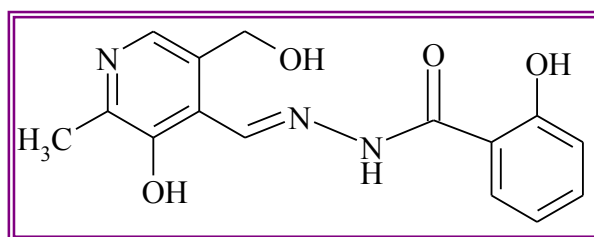


Este reactivo tiene un pK_1 de 3,6 y un pK_2 de 11,1. La primera constante de ionización puede atribuirse a la protonación del nitrógeno piridínico y la segunda constante es debida a la desprotonación del hidrógeno en el grupo $-CONH-$, cuando éste se tautomeriza según la siguiente reacción:



Se ha demostrado que este reactivo forma complejo con Pb(II), Mn(II), Ga(III), Zn(II), Ti(IV), Hg(II), Ni(II), Bi(III), V(V), Fe(II), Pd(II), Cu(II), Co(II), Cd(II), y Fe(III) [59, 62].

c) PSH: saliciloilhidrazona del piridoxal



Tal y como indicamos en la Introducción, esta saliciloilhidrazona tiene un valor de $pK_1 = 4,0 \pm 0,1$ y un $pK_2 = 7,9 \pm 0,1$. La primera constante de ionización puede atribuirse a la desprotonación del nitrógeno piridínico, el segundo pK corresponde a la ionización de los grupos $-OH$ que posee el reactivo.

Se ha demostrado que este reactivo forma complejo con Al(III), Cu(II), Ni(II), Ti(IV), Ga(III), Co(II), Zn(II) y Zr(IV), entre otros [51, 63].

Las pruebas previas de aplicabilidad que se realizaron con estos tres reactivos se llevaron a cabo con discos de C18. Para ello se comenzó el estudio evaluando la retención de las trazas metálicas a diferentes pH sin empleo de reactivo. Estos valores se consideran como los “blancos” de la retención del metal para ser comparados con la retención mediante el empleo del reactivo orgánico que se utilice.

En la Tabla 6 se pueden observar los valores de recuperación obtenidos para cada metal, tras el proceso de extracción sin reactivo. Los porcentajes de recuperación se calculan a partir de la concentración teórica que se obtiene tras la preconcentración y elución de una muestra de 500 mL que contiene 40 ppb de metal, de manera que si se obtiene un 100% de recuperación, significa que el eluato (de volumen 10 mL) presenta una concentración final de 2 ppm de metal. El pH de la muestra fue ajustado con NaOH 0,1 M y/o HNO₃ 0,1 M. No se realizaron pruebas a elevados valores de pH porque a partir de pH 8 los discos de C18 pueden sufrir hidrólisis. El eluyente utilizado fue una disolución de HNO₃ 0,5 M.

De los valores obtenidos en este estudio se puede deducir que un aumento en el pH, y por tanto, en la concentración de NaOH adicionada a la muestra, incrementa la concentración obtenida de cada metal tras eluir con HNO₃ 0,5 M. Este hecho está posiblemente relacionado con que el aumento de la cantidad de base adicionada a la disolución metálica, aumenta la cantidad de grupos hidroxilos con los cuales los metales pueden reaccionar formando hidróxidos de tipo M(OH)_x. Estos hidróxidos pueden quedar retenidos en el filtro y eluidos finalmente por el ácido, proporcionando cierta retención del metal sin empleo de ningún reactivo que favorezca este proceso.

Después de este estudio, se realizaron diferentes pruebas de preconcentración de metal pero utilizando los reactivos orgánicos anteriormente mencionados para incrementar el porcentaje de retención. Para ello, se inmovilizaron 5 mg de reactivo en los discos de membrana antes de la preconcentración de metal. La inmovilización se realizó pasando libre y lentamente por el disco una disolución orgánica del reactivo. En el caso de la 2HBBH y la 2APBH, se utilizó como disolvente 2 mL de cloroformo; en el caso de la PSH, dada su baja solubilidad en cloroformo, se utilizaron 2,5 mL de metanol. En todos los casos, se utilizó como eluyente una disolución de HNO₃ 0,5 M. De todos los metales estudiados, se recogen en la Tabla 7 los resultados más significativos obtenidos utilizando filtros de membrana **C18**.

Tabla 6. Estudio de la retención metálica en filtros C18 para Cd, Cu, Pb, Ni, Ag y Co sin empleo de reactivo orgánico (concentración de metal en la muestra: 40 ppb; factor de preconcentración: 50)

Metal	pH de la muestra	Concentración del extracto (ppm)	% Recuperación
Cd	2,06	< Límite de Detección	-
	4,01	0,028	1,4%
	6,03	0,019	0,9%
	7,64	0,243	12,1%
Cu	2,1	< Límite de Detección	-
	4,08	0,015	0,8%
	6,19	0,173	8,7%
	7,51	0,300	14,5%
Pb	2,1	0,033	1,7%
	4,08	0,085	4,3%
	6,19	0,533	26,6%
	7,51	0,644	32,2%
Ni	2,08	0,013	0,7%
	4,09	0,044	2,2%
	6,11	0,075	3,8%
	7,23	0,148	7,4%
Ag	2,08	< Límite de Detección	-
	4,09	0,007	0,3%
	6,11	0,057	2,9%
	7,23	0,117	5,9%
Co	5,97	0,098	4,9%

Tabla 7. Estudio de la retención metálica en filtros C18 con 2HBBH, 2APBH o PSH inmovilizados a diferentes valores de pH de la muestra (concentración de metal en la muestra: 40 ppb; factor de preconcentración: 50)

Reactivo	Metal	pH de la muestra		% Recuperación
		pH inicial	pH final	
2HBBH	Co	6,0	5,4	6,5%
	Ni	6,2	6,0	12,2%
	Cu	4,1	4,1	1,5%
2APBH	Cu	6,0	6,0	6,2%
	Ni	6,2	6,2	6,5%
	Co	6,1	5,8	3,2%
PSH	Cu	4,6	4,5	13,0%
	Cd	4,1	4,2	-

A la vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que los discos C18 no proporcionan recuperaciones muy elevadas, bien porque el reactivo no tenga las propiedades adecuadas para que se retenga en el disco, o bien porque el complejo que se pudiera formar, no sea lo suficientemente apolar como para que se adsorba (como se ha indicado en la Introducción de esta Memoria), ya que el adsorbente octadecil sílice únicamente es capaz de retener compuestos apolares.

Se realizaron experiencias similares con los filtros de membrana **SDB**. En este caso el reactivo más adecuado para su inmovilización fue la PSH a valores de pH ligeramente ácidos, que además presentaba valores de retención de metal muy pequeños en ausencia de reactivo. Los estudios realizados sobre retención metálica se recogen en la Tabla 8. De los resultados obtenidos se pudo comprobar que utilizando discos de membrana SDB se conseguía una gran recuperación en el caso del reactivo PSH con cobre a pH de 4,6 para la muestra. Además, de los estudios realizados para la retención del metal sin reactivo a diferentes valores de pH se había obtenido previamente una recuperación pequeña del 6,6 %. Por todo ello, se puede asegurar que la presencia del reactivo *saliciloilhidrazona del piridoxal (PSH)* inmovilizado es capaz de retener satisfactoriamente en el adsorbente poliestireno divinilbenceno y de formar complejo con cobre a pH 4,6. Por ello, se seleccionó este reactivo y este metal para proponer un nuevo método de preconcentración mediante la técnica de extracción en fase sólida con discos de membrana SDB trabajando a valores de pH próximos a 4.

Tabla 8. Estudio de la retención metálica en filtros SDB con PSH inmovilizada a valores de pH de la muestra ligeramente ácidos (concentración de metal en la muestra: 40 ppb; factor de preconcentración: 50)

Reactivo	Metal	pH de la muestra pH inicial	pH final	% Recuperación
PSH	Cd	3,0	3,0	0%
	Cd	4,2	4,5	9,3%
	Cd	6,3	6,3	5,3%
	Cu	4,6	4,7	93,5%

VI.2. Estudio de la estequiometría del complejo Cu-PSH

Una vez encontrado el reactivo orgánico que es capaz de inmovilizarse de forma satisfactoria en los discos y formar complejo con el cobre, se realizó el estudio de la determinación de la estequiometría del complejo Cu-PSH, con objeto de conocer la naturaleza de la reacción complejante. Para ello, se ha empleado el método de las variaciones continuas.

Esta técnica permite determinar el número de ligandos que coordinan al metal en un complejo metálico. Este método requiere preparar distintas disoluciones de concentración conocida del ión metálico y de ligando, manteniendo constante el número de moles totales presentes en la disolución. Se mide la absorbancia de dichas disoluciones y se representan los valores obtenidos frente a la fracción molar del metal. En una curva típica se puede observar cómo va incrementándose el valor de la absorbancia a medida que aumenta la fracción molar del metal. Una vez que la curva llega a su máximo (punto que representa la relación estequiométrica del complejo) va descendiendo puesto que existe una cantidad insuficiente del ligando en la formación del complejo metálico.

Para la aplicación de este método se requiere conocer el máximo de absorción del complejo Cu-PSH. Por ello, se realizó una disolución previa con 3 ppm de Cu(II) a pH 4 con 2 mL de PSH de una concentración de 0,0125% en etanol-DMF (9:1 v:v), enrasando a 10 mL. Se registró su espectro de Absorción Molecular UV-Visible, obteniéndose un máximo a una longitud de onda de 420 nm.

Se estudió la estequiometría del complejo de Cu(II) con la *saliciloilhidrazona del piridoxal* regulando la disolución con tampón Ácido Acético/Acetato (AcH/Ac^-) a pH 4. Para aplicar el método de las variaciones continuas se prepararon disoluciones diluidas de Cu(II) de 10 y 20 mg/L y de *saliciloilhidrazona del piridoxal* de 0,0125% en etanol-dimetilformamida (DMF) (9:1 v:v). Con ellas, se prepararon varias muestras con diferente fracción molar de Cu(II), manteniendo constante el número de moles totales. Así, se añadieron en matraces aforados de 10 mL: 1,25 mL de disolución tampón AcH/Ac^- (8 M) de pH 4, un volumen variable de disolución de Cu(II) de 10 o 20 mg/L, un volumen variable de *saliciloilhidrazona del piridoxal* de 0,0125% en etanol-DMF (9:1 v:v), enrasando todo hasta 10 mL con agua Milli-Q. Las disoluciones se trataron

con ultrasonido durante 3 minutos y se midió su absorbancia a 420 nm frente a sus respectivos blancos (disoluciones con la misma matriz pero en ausencia del metal).

En la Tabla 9 se detallan los volúmenes necesarios para preparar las muestras con las que se realizó el estudio de la estequiometría: volumen de reactivo, volumen de disolución de Cu(II), fracción molar de Cu(II) y los valores de Absorbancia obtenidos a la longitud de onda de máxima absorción del complejo metálico. Los valores de absorbancia se han representado frente a la fracción molar de metal en la Figura 6. Como se puede observar en esta figura, el máximo de absorbancia obtenido corresponde a una fracción molar de Cu(II) de 0,643, aproximadamente 0,666. Teniendo en cuenta que la fracción molar de Cu(II) es de la forma:

$$\chi = \frac{\text{moles de Cu (II)}}{\text{moles totales}} = \frac{\text{moles de Cu (II)}}{\text{moles de Cu (II)} + \text{moles de PSH}} = 0,666 = \frac{2}{3}$$

se deduce que la estequiometría del complejo Cu-PSH es de 2:1, catión:ligando, es decir, Cu(PSH)₂.

Tabla 9. Estudio de la estequiometría del complejo PSH:Cu: preparación de las muestras (volumen final = 10 mL) y valor de la absorbancia

Volumen de PSH 0,0125% (mL)	Volumen de Cu(II) adicionado (mL)	Concentración de Cu(II) (mg/L)	Fracción molar de Cu(II)	Absorbancia 420 nm
3,3	0,15	10	0,0169	0,084
3	1	10	0,1126	0,271
2,5	2,25	10	0,2540	0,700
2	3,6	10	0,4056	1,124
1,5	4,9	10	0,5543	1,434
1	3,1	20	0,7044	1,492
0,5	3,75	20	0,8490	0,732
0,25	4,1	20	0,9282	0,355

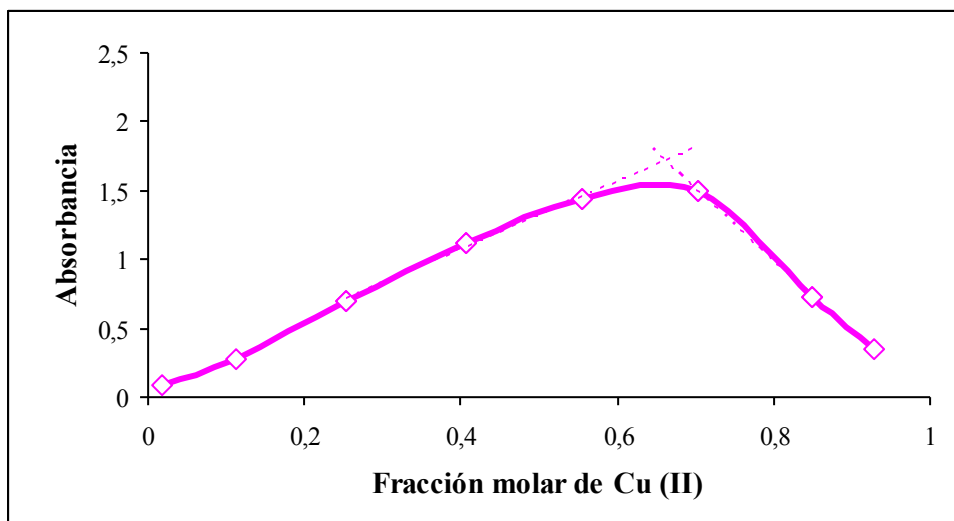


Figura 6. Aplicación del método de las variaciones continuas al cálculo de la estequiometría del complejo Cu-PSH (absorbancia medida a 420 nm).

VII. Optimización del método

Una vez elegido el reactivo adecuado para desarrollar el método de preconcentración y análisis de trazas de cobre y conocido el complejo metálico que se forma entre el reactivo y el metal, se pasa a la optimización de los parámetros que influyen en la técnica de preconcentración.

Los parámetros que influyen en el método de extracción en fase sólida son los siguientes:

- Tipo de eluyente: existen varios tipos de ácidos que se pueden utilizar como eluyentes a distintas concentraciones. El más adecuado será aquél que consiga destruir de manera efectiva el complejo PSH-Cu para la elución del metal.
- Volumen de eluyente: con objeto de obtener altos factores de preconcentración, es necesario encontrar volúmenes pequeños que sean suficientes para destruir el complejo y que eluyan el metal con una elevada recuperación.
- pH: dependiendo del pH, el reactivo se encontrará en su forma neutra o cargado, con lo que influirá en su capacidad de retención en el disco. Asimismo, el pH también influye en la formación del complejo, por lo que habrá que buscar un

valor de pH apropiado para que el reactivo quede adsorbido sobre el disco de membrana y compleje de forma eficaz al cobre.

- Cantidad de reactivo: este factor es muy importante a la hora de realizar la extracción en fase sólida. Dado que la formación de complejo depende directamente de la cantidad de reactivo, se debe de encontrar un valor que sea adecuado para que todo el metal presente en la muestra quede complejoado con el reactivo. Por ello, se iniciarán los estudios con suficiente cantidad de reactivo, inmovilizando una cantidad inicial de 5 mg de PSH (Peso molecular = 319 g/mol) y preconcentrando una muestra que contiene 20 µg de Cu(II), que se corresponde con una relación molar catión:ligando de 1:50.

Con estos parámetros, se pasó a realizar la optimización del método de preconcentración por extracción en fase sólida tratando de obtener la máxima recuperación cuantitativa del analito de interés: Cu(II).

VII.1. Influencia de la naturaleza del eluyente en la extracción en fase sólida con membrana SDB inmovilizada con PSH

Se seleccionaron tres ácidos distintos, de los cuales uno es débil (CH_3COOH) y dos son fuertes (HCl y HNO_3) y se aplicaron como eluyentes a tres concentraciones diferentes: 0,5, 1 y 2 M.

Las pruebas se realizaron en la siguientes condiciones: se inmovilizaron 5 mg de *saliciloilhidrazona del piridoxal* disueltos en 2,5 mL de metanol; el valor de pH de la muestra (controlado con NaOH 0,1 M y/o HNO_3 0,1 M.) fue aproximadamente de 4,6 conteniendo una concentración de Cu(II) de 40 ppb. El volumen de muestra a preconcentrar fue de 500 mL y el volumen de eluyente utilizado fue de 10 mL, con lo que se obtenían factores de preconcentración de 50 unidades.

a) Estudio del ácido acético como eluyente

El porcentaje de recuperación de Cu(II) obtenido para cada una de las eluciones realizadas con diferentes disoluciones de ácido acético se han detallado en la Tabla 10 y se han representado en la Figura 7. Al utilizar una concentración baja de ácido acético, se obtiene una recuperación muy pequeña. Al ir aumentando la molaridad del ácido, aumenta el metal extraído, pero no se llega a obtener una recuperación cuantitativa. Esto

se debe a que el ácido acético no es un ácido suficientemente fuerte como para favorecer la destrucción del complejo estable Cu-PSH retenido en el disco de membrana.

Tabla 10. Estudio del porcentaje de recuperación de Cu(II) (20 µg) retenido en SDB con PSH inmovilizado para diferentes concentraciones de Ácido Acético

Concentración Ácido Acético (M)	pH de la muestra		% Recuperación
	pH inicial	pH final	
0,5 M	4,6	4,4	6,9%
1 M	4,5	4,4	27,9%
2 M	4,6	4,4	82,9%

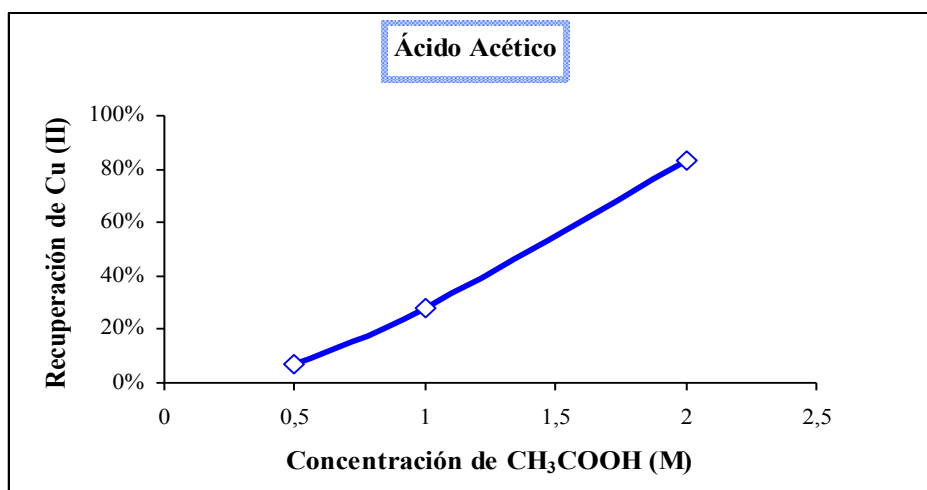


Figura 7. Porcentaje de recuperación de Cu(II) (20 µg) con Ácido Acético.

b) Estudio del ácido nítrico como eluyente

Los valores de porcentaje de recuperación de Cu(II) obtenido para cada una de las eluciones realizadas con ácido nítrico se detallan en la Tabla 11 y en la Figura 8. En este caso, se puede observar que este eluyente es más adecuado que el anterior, puesto que produce recuperaciones completas del metal, y debido probablemente a su naturaleza de

ácido fuerte. Así, a partir de concentración de 1 M ya se obtiene una extracción cuantitativa.

Tabla 11. Estudio del porcentaje de recuperación de Cu(II) (20 µg) retenido en DSB con PSH inmovilizado para diferentes concentraciones de Ácido Nítrico

Concentración Ácido Nítrico (M)	pH de la muestra		% Recuperación
	pH inicial	pH final	
0,5 M	4,6	4,7	93,5%
1 M	4,6	4,6	101,4%
2 M	4,6	4,4	102,8%

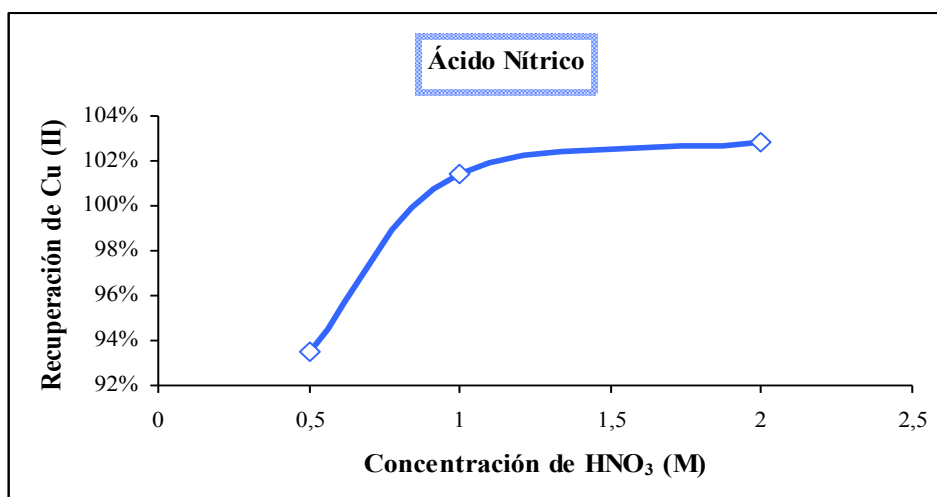


Figura 8. Porcentaje de recuperación de Cu(II) (20 µg) con Ácido Nítrico

c) Estudio del ácido clorhídrico como eluyente

Los resultados obtenidos para la elución con ácido clorhídrico se resumen en la Tabla 12 y se han representado gráficamente en la Figura 9. Este ácido proporcionó valores de recuperación cuantitativa a valores de concentración baja. Por lo que su utilización disminuye el coste del proceso de extracción al utilizar menos cantidad de ácido.

Tabla 12. Estudio del porcentaje de recuperación de Cu(II) (20 µg) retenido en DSB con PSH inmovilizado para diferentes concentraciones de Ácido Clorhídrico

Concentración Ácido Clorhídrico (M)	pH de la muestra		% Recuperación
	pH inicial	pH final	
0,5 M	4,7	4,3	101,6%
1 M	4,5	4,3	101,6%
2 M	4,6	4,4	95,7%

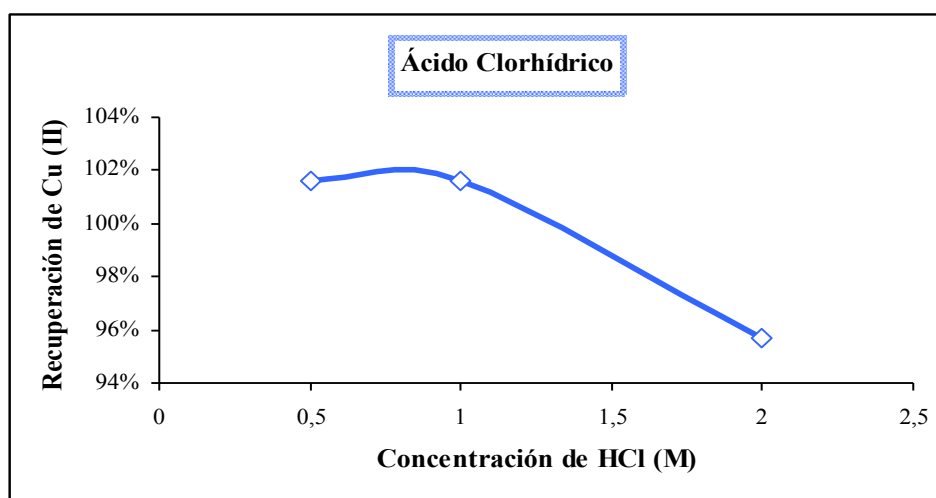


Figura 9. Porcentaje de recuperación de Cu(II) (20 µg) con Ácido Clorhídrico.

Como conclusión, tanto el ácido nítrico desde una concentración de 1 M como el ácido clorhídrico desde una concentración de 0,5 M son capaces de eluir de forma eficaz el metal por destrucción del complejo que se forma entre la *saliciloilhidrazona del piridoxal* y el cobre, y, por tanto, proporcionan una recuperación cercana al 100%.

VII.2. Estudio del volumen de eluyente en la recuperación del metal

Las pruebas que se han realizado hasta el momento para el estudio del eluyente se llevaron a cabo con un volumen de 10 mL de cada ácido. En estas condiciones, el proceso de extracción en fase sólida proporciona un factor de preconcentración de 50 unidades. No obstante, por modificación de este volumen se podría incrementar ese factor. Por ello, se pasó a estudiar la influencia en la elución del volumen de ácido empleado.

El procedimiento seguido para este estudio consistió en inmovilizar 5 mg de PSH disueltos en 2,5 mL de metanol y preconcentrar 500 mL de una muestra conteniendo 40 ppb de Cu(II) a pH cercano a 4,6 (controlado con NaOH 0,1 M y/o HNO₃ 0,1 M.). El volumen de eluyente se disminuyó a 5 mL, por lo que se podrían obtener factores de preconcentración de 100.

En la Tabla 13 se recogen los resultados obtenidos con los dos mejores eluyentes estudiados, utilizando 5 mL de disolución de ácido nítrico (para concentraciones 1 M y 2 M) o ácido clorhídrico (0,5 M y 1 M). Igualmente, en esta tabla se comparan estos datos con los obtenidos en el anterior estudio. Así, puede observarse como eluyendo con 5 ml de HNO₃ 1 M no se llega a recuperar todo el cobre contenido en la muestra. Sin embargo, si la elución es realizada con ácido clorhídrico 0,5 M, puede disminuirse el volumen del eluyente a 5 mL y aumentar el factor de preconcentración, pues se obtiene un valor de recuperación aproximado de 100%.

Como conclusión, podemos decir que 5 mL de HCl 0,5 M es suficiente para obtener un factor de preconcentración de 100 unidades, con una recuperación prácticamente del 100%. Sin embargo, este ácido puede, en ciertos casos, presentar interferencias moleculares en la determinación metálica mediante Espectroscopía de Absorción Atómica, que a su vez es una de las técnicas de determinación metálica más usual después de la preconcentración de trazas de metales en una fase ácida. Por todo ello, se tendrá que tener en cuenta el sistema de detección a la hora de seleccionar el volumen y tipo de eluyente.

Tabla 13. Estudio de la influencia del volumen de eluyente utilizado en el porcentaje de recuperación de Cu(II) (20 µg) retenido en DSB con PSH inmovilizado

Ácido	Concentración (M)	Volumen Eluyente (mL)	pH de la muestra		% Recuperación
			pH inicial	pH final	
HNO ₃	1 M	5	4,6	4,5	95,3%
		10	4,6	4,6	101,4%
	2 M	5	4,5	4,5	93,2%
		10	4,6	4,6	101,4%
HCl	0,5 M	5	4,6	4,5	99,9%
		10	4,74	4,27	101,6%
	1 M	5	4,6	4,5	96,4%
		10	4,53	4,30	101,6%

VII.3. Influencia del pH de la muestra en la extracción en fase sólida de Cu(II) con membrana SDB inmovilizada con PSH

El pH de la muestra que se desea preconcentrar es un parámetro fundamental en el proceso de extracción en fase sólida y debe de ser optimizado. Por ello se prepararon diferentes disoluciones reguladoras de ácido acético/acetato 4 M de pH 3,5; 4; 4,6 y 5,7; respectivamente para ser utilizadas en el control del pH. Estas disoluciones tienen la ventaja frente al empleo de NaOH y/o HNO₃, utilizados anteriormente, de que mantienen constante el pH en un rango 3,5-5,5. De esta manera se consigue mejor reproducibilidad durante el ajuste del pH de la muestra. Las restantes condiciones del proceso de extracción fueron similares a las ya descritas, utilizando 5 mg de PSH disueltos en 2,5 mL de metanol, un volumen de muestra de 500 mL con 40 ppb de Cu(II) y eluyendo con 10 mL de HNO₃, ya que la detección se realizó mediante Espectroscopía de Absorción atómica con llama. Los resultados obtenidos se recogen en la Figura 10, donde se ha representado el porcentaje de recuperación obtenido para cada valor de pH estudiado.

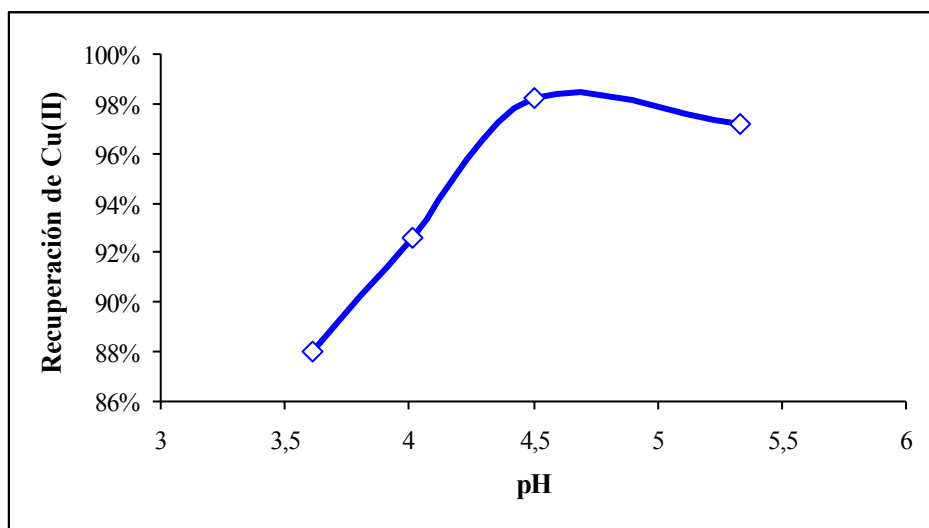


Figura 10. Influencia del pH de la muestra en el porcentaje de recuperación de Cu(II) (20 µg) empleando disolución reguladora de Ácido Acético/Acetato Sódico

Se puede observar que el máximo de recuperación se encuentra para valores de pH próximos a 4,5, por lo que se adicionará disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico de pH 4,5 a las muestras de agua que se deseen preconcentrar, con una concentración final de 0,4 M.

Hay que destacar que el porcentaje máximo obtenido fue de un 98,22 %, algo menor que el que se obtuvo controlando el pH de la muestra con disolución de NaOH. Por ello, se estudió en estas nuevas condiciones si un incremento en el volumen de eluyente mejoraba este porcentaje de extracción. Por ello, se aplicó el método de preconcentración, controlando el pH de la muestra con disolución reguladora de pH 4,5 y se realizó la elución con 15 mL de ácido nítrico 1 M. Los valores de los restantes parámetros fueron los seleccionados previamente. El valor del porcentaje de recuperación fue del 98,97 % para una muestra con 20 µg de Cu(II), muy próximo al valor de 98,22% obtenido con 10 mL de eluyente, por lo que no representa ninguna mejora este incremento de volumen, y sin embargo, disminuye el factor de preconcentración del método y aumenta el consumo de ácido.

VII.4. Estudio de la influencia de la cantidad de reactivo inmovilizado en el filtro de membrana de SDB en la recuperación del metal

En todas las experiencias realizadas y descritas hasta el momento, se emplearon 5 mg de *saliciloilhidrazona del piridoxal* en 2,5 mL de metanol, los cuales eran inmovilizados en el filtro de poliestireno divinilbenceno, favoreciendo la retención del metal de la muestra para su preconcentración.

No obstante, se decidió estudiar si la cantidad de reactivo influía de forma significativa en el sistema de preconcentración. Por ello, se inmovilizaron sobre el filtro diferentes cantidades de PSH: 0; 2,5; 5; y 7 mg en 2,5 mL de metanol. Los resultados se detallan en la Tabla 14. De este estudio se pudo comprobar que 2,5 mg de reactivo eran suficientes para una recuperación cuantitativa. Además, con el primer experimento se evaluó la retención metálica en el filtro en ausencia de reactivo. Con el último experimento, en donde se emplearon 7 mg de PSH, se observó un cierto entrapamiento de la membrana, que dificultó el proceso de preconcentración, por lo que no se pudieron obtener resultados fiables de la experiencia. Por ello, y a partir de este estudio se

decidió utilizar para los siguientes experimentos 2,5 mg de de *saliciloilhidrazona del piridoxal*.

Tabla 14. Estudio de influencia de la cantidad de reactivo inmovilizado en el porcentaje de recuperación de Cu(II) (20 µg)

Cantidad de PSH	% Recuperación
0 mg	6,6%
2,5 mg	99,5%
5 mg	98,2%
7 mg	Obstrucción de la membrana

VIII. Procedimiento propuesto para la preconcentración de Cu(II)

Concluido el estudio del sistema seleccionado, se propuso un nuevo método de preconcentración de trazas de cobre en muestras acuosas mediante extracción en fase sólida con PSH inmovilizada en discos de membrana de poliestireno divinilbenceno. A continuación se detalla un resumen de los parámetros optimizados del método:

- Naturaleza del eluyente: disolución de HNO₃ de concentración 1M.
- Volumen de eluyente: 10 mL.
- pH de la muestra: 4,5.
- Disolución reguladora de pH de la muestra: ácido acético/acetato sódico 0,4 M
- Cantidad de reactivo inmovilizado: 2,5 mg de *saliciloilhidrazona del piridoxal* disueltos en 2,5 ml de metanol.
- Volumen de muestra: 500 mL

IX. Características analíticas del método

Una vez propuesto el método que se ha desarrollado y optimizado en esta investigación, se pasó a estudiar el intervalo de aplicabilidad del mismo, tanto en relación a la cantidad de metal que se puede retener como al volumen de muestra que puede ser pasado por el filtro sin pérdida apreciable de reactivo inmovilizado. Por último, también se incluye en este estudio la reproducibilidad de la preconcentración.

IX.1. Intervalo de aplicabilidad del método: cantidad de metal en la muestra de agua

Con el fin de comprobar la recuperación de cobre en muestras acuosas de diferente concentración metálica, se prepararon diferentes muestras sintéticas a las que se adicionó Cu(II) a las concentraciones usuales en las que se suele encontrar este metal en las aguas naturales: 10, 20, 30, 40, 60 y 80 ppb. Los parámetros del método de preconcentración utilizados fueron los anteriormente optimizados, es decir:

- Eluyente: 10 mL de HNO₃ 1M.
- pH de la muestra: 4,5 regulada con disolución de ácido acético/acetato sódico 0,4 M.
- Cantidad de reactivo inmovilizado: 2,5 mg de *saliciloilhidrazona del piridoxal* disueltos en 2,5 ml de metanol.

El volumen de muestra que se preconcentró fue en todos los casos de 500 mL. Los resultados que se obtuvieron fueron prácticamente del 100 %, dando lugar a una recuperación cuantitativa del metal para todas las muestras en el intervalo estudiado de 10 a 60 ppb. Para muestras con concentraciones superiores (a partir de 80 ppb) la recuperación comenzó a disminuir en un 30%, debido probablemente a la saturación del disco de membrana. No obstante, el método resulta interesante para muestras de baja concentración, y en caso de aplicarlo con objeto de eliminar la matriz de la muestra se puede aplicar utilizando menor volumen de muestra, lo que impediría la saturación de la membrana.

IX.2. Intervalo de aplicabilidad del método: volumen de muestra

Como se ha explicado anteriormente en la Introducción de esta Memoria, la *saliciloilhidrazona del piridoxal* es un reactivo orgánico poco soluble en agua. Su límite de solubilidad es de 0,6 g en 1 L. Si se supera este valor, la PSH no se disuelve. Sin embargo, si se pone en contacto con una cantidad considerable de agua, es susceptible de sufrir una disolución parcial. En el método que se ha desarrollado es fundamental que el reactivo se encuentre retenido en el disco durante el proceso completo de extracción. En el caso de que éste se disuelva al hacer pasar la muestra acuosa, la recuperación de Cu(II) no sería cuantitativa.

Por este motivo, es de vital importancia estudiar el máximo volumen de muestra que se puede tratar en el proceso de preconcentración por extracción en fase sólida, sin que se produzca una pérdida significativa del reactivo inmovilizado y con ello se reduzca el rendimiento del método.

Así, se realizaron diferentes experiencias variando el volumen de muestra con las condiciones definidas para el método propuesto. En todos los casos la cantidad de Cu(II) permaneció constante, con un valor de 20 µg, con lo que el factor de preconcentración siempre fue de 50 unidades; únicamente se modificó el volumen total de disolución, siendo por tanto las muestras cada vez más diluidas al incrementarse el volumen de muestra. En la Tabla 15 se detallan los resultados obtenidos. Puede observarse como volúmenes de muestra de 1 litro comienzan a producir una disminución en la recuperación del metal, probablemente debido a una pérdida de retención del reactivo y/o del complejo metálico en el disco de membrana.

Tabla 15. Influencia del volumen de muestra en la recuperación de Cu(II) (20 µg)

Volumen de muestra (mL)	Concentración de Cu(II) (ppb)	% Recuperación
500	40	99,5 %
750	26,7	100,5 %
1000	20	74,2 %

IX.3. Reproducibilidad de la medida

Por último, se pasó al estudio de la reproducibilidad del método de preconcentración. Para ello se realizaron diversas preconcentraciones, con 3 réplicas de una muestra conteniendo la misma cantidad de metal. Los parámetros del método utilizados fueron:

- Eluyente: 10 mL de HNO₃ 1M.
- pH de la muestra: 4,5 regulada con disolución de ácido acético/acetato sódico 0,4 M.
- Cantidad de reactivo: 2,5 mg de *saliciloilhidrazona del piridoxal* disueltos en 2,5 ml de metanol.

- Volumen y concentración de la muestra: 500 mL con una cantidad de 20 μg Cu(II) y, por tanto, una concentración de 40 ppb.

Los resultados proporcionaron una reproducibilidad del **$100,36 \pm 1,24 \%$** , obtenida aplicando el nuevo método propuesto de extracción en fase sólida de trazas de cobre.

Conclusiones

CONCLUSIONES

De los trabajos descritos en esta memoria, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Se ha demostrado la aplicabilidad de la *saliciloilhidrazona del piridoxal* como reactivo analítico para la extracción de cobre en fase sólida, mediante la formación del complejo Cu-PSH.

- Se ha comprobado que el reactivo queda retenido sobre los discos de poliestireno divinilbenceno.
- Se ha comprobado que el reactivo es capaz de formar complejo con Cu(II) sobre los discos.
- Se ha caracterizado el complejo formado, estudiando la estequiometría catión-ligando empleando el método de las variaciones continuas. La relación estequiométrica del complejo es 2:1, catión:ligando.

2. Se ha demostrado la utilidad de la técnica de extracción en fase sólida con discos de membrana para la preconcentración de trazas metálicas.

3. Se ha desarrollado un método analítico para la preconcentración de cobre en muestras de aguas, basado en la extracción en fase sólida del complejo Cu-PSH sobre discos de poliestireno divinilbenceno.

- Se ha estudiado el efecto de distintos parámetros que influyen en el proceso de preconcentración, encontrándose que las condiciones óptimas para llevar a cabo el proceso son las siguientes:
 - Eluyente: HNO₃ 1M
 - Volumen de eluyente: 10 mL
 - pH óptimo: 4,4
 - Cantidad de reactivo: 2,5 mg de PSH disueltos en 2,5 mL de metanol.
- Se ha estudiado la influencia del volumen de muestra, resultando ser un método eficaz para volúmenes de hasta 750 mL.

- Se ha estudiado la reproducibilidad de la medida, obteniéndose un resultado de $(100,36 \pm 1,24) \%$.
- Se ha estudiado la influencia de la concentración de metal, encontrándose que se alcanza un 100% de recuperación para muestras con concentraciones de hasta 60 ppb y volúmenes de 500 mL. Para concentraciones mayores, se deben de utilizar menores volúmenes de muestra, con objeto de evitar la saturación del disco de membrana y la disminución en la recuperación del metal.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

1. Pérez-Bendito, D.; Rubio, S; Comprehensive Analytical Chemistry, Volume XXXII: Environmental Analytical Chemistry, 1999.
2. Azcue, J. M.; Metales en el Medio Ambiente y Díaz Mayans, J.; Torreblanca, A.; del Ramo, J.; Presencia de Metales en el Medio Acuático, en Mas, A.; Azcue, J. M.; Metales en Sistemas Biológicos, Promociones y Publicaciones Universitarias, S.A., Barcelona, 1993.
3. Safavi, A.; Maleki, N.; Farjami, F.; Talanta 54 (2) 397-402, 2001.
4. Mas, A.; Elementos esenciales; en Mas, A.; Azcue, J.M.; Metales en Sistemas Biológicos, Promociones y Publicaciones Universitarias, S.A., Barcelona, 1993.
5. Crompton, T. R.; Toxicants in the Aqueous Ecosystem, Wiley & Sons, New York, 1998.
6. Ebdon, L.; Evans, E. H.; Fisher, A. S.; Hill, S. J.; An Introduction to Analytical Atomic Spectrometry, Wiley, New York, USA, 1998.
7. Thurman, E. M.; Mills, M.S.; Solid Phase Extraction. Principles and Practice, Wiley, New York, USA, 1998.
8. Majors, R. E.; LC-GC 4, 972, 1989.
9. Hagen, D.F.; Markell, C.G.; Schmitt, G.A.; Blevins D.D.; Analytica Chimica Acta, 236 (1) 157-164, 1990.
10. Fritz, J. S.; Analytical Solid-Phase Extraction, Wiley, New York, USA, 1999.
11. Wilson, I.; Poole, C.; Cooke, M; Encyclopedia of Separation Science, Chapter: Extraction / Solid-Phase Extraction, 4141-4148, 2000.
12. Yamini, Y.; Tamaddon, A.; Talanta 49 (1) 119-124, 1999.
13. Lingeman, H.; Hoekstra-Oussoren, S. J. F.; Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 689, 221-237, 1997.
14. Thurman, E. M.; Snavelly, K.; Trends in Analytical Chemistry, 19, 18-26, 2001.
15. Fritz, J. S.; Masso, J.; Journal of Chromatography A 909, 79-85, 2001.
16. General Guidelines for Empore Extraction Disks: http://solutions.3m.com/wps/portal/3M/en_US/Empore/extraction/products/disks.
17. General Guidelines for Empore Extraction Cartridges: http://solutions.3m.com/wps/portal/3M/en_US/Empore/extraction/products/cartridges.
18. Björklund, L. B.; Morrison, G. M.; Analytica Chimica Acta, 343 (3) 259-266, 1997.

19. Poole, C. F.; Trends in Analytical Chemistry, 22 (6) 362-373, 2003.
20. Raoufi, F.; Yamini, Y.; Sharghi, H.; Shamsipur, M.; Microchemical Journal, 63, 311-316, 1999.
21. Shamsipur, M.; Raoufi, F.; Sharghi H.; Talanta 52 (4) 637-643, 2000.
22. Hashemi, O. R.; Kargar, M. R.; Raoufi, F.; Moghimi, A.; Aghabozorg, H.; Ganjali, M. R.; Microchemical Journal 69, 1-6, 2001.
23. Arena, M. P.; Porter, M. D.; Fritz, J. S.; Analytica Chimica Acta, 482 (2) 197-207, 2003.
24. A. R. Khorrami, H. Naeimi, A. R. Fakhari; Talanta 64 (1) 13-17, 2004.
25. C. Pons, R. Fortaleza, V. Cerdà; Analytica Chimica Acta, 550 (1-2) 33-39, 2005.
26. Rathore, B. S.; Ittyerah, P. I.; Journal of the Indian Chemical Society, 37, 591-593, 1960.
27. Ten, L. A.; Vasil'eva, R. L.; Izvestiya Akademi Nauk Seriya SSR, Ser. Khim, 5, 77-80, 1983.
28. Kitaev, Yu. P.; Buzykin, B. I.; Troepol'skaya, T. V.; Russian Chemical Review, 39 (6), 441-456, 1970.
29. Abdelrahman, R. M.; Seada, M.; Fawzy, M.; El-Baz, I.; Fármaco, 48 (3), 397-406, 1993.
30. Kratz, F.; Beyer, U.; Roth, T.; Schuttle, M.; Unold, A.; Fiebig, H. H.; Unger, C.; Archiv der Pharmazie, 331 (2), 47-53, 1998.
31. Kratz, F.; Beyer, U.; Roth, T.; Tarasova, N.; Collery, P.; Lechenault, F.; Cazabat, A.; Shumacher, P.; Unger, C.; Falken, U.; Journal of Phamaceutical Sciences, 87 (3), 338-346, 1998.
32. Kratz, F.; Beyer, U.; Collery, P.; Lechenault, F.; Cazabat, A.; Shumacher, P.; Unger, C.; Falken, U.; Biological & Phamaceutical Bulletin, 21 (1), 51-56, 1998.
33. Shen, X.; Li, Q.; Jiang, H.L.; Xie, Y.Y.; Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-organic Chemistry, 25 (8), 1239-1247, 1995.
34. Srivastava, V.; Sen, S.; Shelkhar, R.; Indian Journal of Chemistry Section B, 32 (9), 946-952, 1993.
35. Bergamaschi, G.; Bonardi, A.; Leoparati, E.; Mazza, P.; Journal of Inorganic Biochemistry, 68 (4), 295-305, 1997.
36. Beland, F. A.; Dooley, K. L.; Hansen, E. B.; Sheldon, W. G.; Journal of the American College of the Toxicology, 14 (4), 328-342, 1995.

37. De la Peña, L.; Gómez Hens, A.; Pérez Bendito, D.; *Analytica Chimica Acta*, 283 (1), 471-475, 1993.
38. Sreeghar, K.; Sastry, C. S. P.; Reddy, M. N.; Sankar, D. G.; *Talanta* 43 (11), 1847-1855, 1996.
39. Sastry, C. S. P.; Naidu, P. Y.; Murty, S. S. N.; *Talanta* 44 (7), 1211-1217, 1997.
40. Sastry, C. S. P.; Rekha, T. V.; Satyanarayana, A.; *Microchimica Acta*, 128 (3-4), 201-205, 1998.
41. Karlberg, A. T.; Share, L.; Lindberg, I.; Nyhammar, E.; *Contact Dermatitis*, 38 (1), 20-28, 1998.
42. Cremlyn, R. J.; Ellan, R. M.; Farouk, S.; *Pesticide Science*, 52 (1), 70-74, 1998.
43. Zurek, G.; Karst, U.; *Journal of Chromatography A*, 869, 251-259, 2000.
44. Lindhal, R.; Levin, J. O.; Matensson, M.; *Analyst*, 121 (9), 177-1181, 1996.
45. Possanzini, M.; Dipalo, V.; *Chromatographia*, 46 (5-6), 235-240, 1997.
46. Chan, W.H.; Xie, T. Y.; *Analytica Chimica Acta*, 349 (1-3), 349-357, 1997.
47. Kleindienst, T. E.; Corse, E. W.; Blandchard, F. T.; Lonneman, W. A.; *Environmental Science and Technology*, 32 (1), 124-130, 1998.
48. Fiehn, O.; Jekel, M.; *Journal of Chromatography A*, 769 (2), 189-200, 1997.
49. Russell, I. M.; Burton, S. G.; *Analytica Chimica Acta*, 389, 161-170, 1999.
50. Dawit, M.; Williams, I. D.; Fitzsimons, M. F.; *Water Research*, 35 (5) 1135-1140, 2001.
51. Gallego, M.; Valcárcel, M.; García-Vargas, M.; *Analytica Chimica Acta*, 138, 311-320, 1982.
52. Williams, A.; Hoy, T.; Jacobs, A.; *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 34, 730-732, 1982.
53. Edward, J. T.; Ponka, P.; Richardson, D. R.; *Biometals*, 8, 209-217, 1995.
54. Edward, J. T.; Chubs, F. L.; Sandster, J.; *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 75, 1362-1368, 1997.
55. Edward, J. T.; *Biometals*, 11, 203-205, 1998.
56. Katyal, M.; Dutt, Yag; *Talanta*, 22, 151-166, 1975.
57. Cordier, C.; Vauthier, E.; Adenier, A.; Lu, Y.; Massat, A.; Cossé-Barbi, A.; *Structural Chemistry*, 15 (4) 295-307, 2004.

58. Lu, Y.-H.; Lu, Y.-W.; Wu, C.-L.; Shao, Q.; Chen, X.-L.; Bimbong, R.N.B.; *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 65 (3-4), 695-701, 2006.
59. García-Vargas, M.; Bautista, J. M.; Toro, P.; *Microchemical Journal*, 26, 557-568, 1981.
60. García-Vargas, M.; Hernández-Artiga, M. P., Pérez-Bustamante, J. A.; *Analytica Chimica Acta*, 157, 363-367, 1984.
61. Granado-Castro, M.D.; Galindo-Riaño, M.D.; García-Vargas, M.; *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy*, 59 (4), 577-583, 2004.
62. Domínguez-Lledó, F.C.; Galindo-Riaño, M.D.; Díaz-López, I.C.; García-Vargas, M.; Granado-Castro, M.D; *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389 (2), 653-659, 2007.
63. Gallego, M.; Valcárcel, M.; García-Vargas M.; *Analyst*, 108, 92-98, 1983.